



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Diseño y formulación de una Forma Farmacéutica
sólida a partir del extracto de *Geranium dielsianum***

Knut "Pasuchaca"

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Recursos
Vegetales y Terapéuticos

AUTOR

Bertran SANTIAGO TRUJILLO

Lima, Perú

2007



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Santiago, B. Diseño y formulación de una Forma Farmacéutica sólida a partir del extracto de *Geranium dielsianum* Knut "Pasuchaca" [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2007.

DEDICATORIA

- A mi esposa, fuente inagotable de amor, persistencia e inspiración
- A mis hijos, razón de mi vida y motivo de superación
- A mi padre, mi primer maestro
- A mi madre, ángel que siempre guiara mis pasos
- A mis profesores y alumnos, motivo de constante renovación

AGRADECIMIENTOS

- A Laboratorios Hersil, que brindó todos sus recursos para el desarrollo de esta investigación.
- A los profesionales de Laboratorios Hersil cuyos conocimientos y habilidades forman parte importante de este trabajo
- A Laboratorios Fitofarma por la información y facilidades en la elaboración del extracto
- A los miembros del Jurado, por sus valiosos aportes y sugerencias

INDICE

Sumario

Resumen

Summary

I. Introducción

II. Generalidades

II.1. Estudio de la especie

II.1.1. Características de la Familia Geraniaceae

II.1.2. Características del Genero Geranium

II.1.3. Ubicación Sistemática de la especie

II.1.4. Descripción morfológica de Geranium dielsianum Knut

II.1.5. Aspectos Etnobotánicos

II.2. Formulación de Tabletas

II.2.1. Preformulación de Medicamentos

II.2.2. Componentes de la Tableta

II.2.3. Métodos de Fabricación

II.2.4. Control de la Calidad de las Tabletas

II.2.5. Estudios de Estabilidad

II.2.6. Estudios Clínicos

III. Materiales y Métodos

III.1. Materiales, Equipos y Reactivos

III.2. Procedimiento Experimental

III.2.1. Obtención del Extracto

III.2.2. Análisis del Extracto

III.2.3. Formulación de la Tableta

III.2.3.1. Formulación Preliminar

III.2.3.2. Formulación Definitiva

III.2.4. Estudio de Estabilidad

III.2.5. Estudio de toxicidad Aguda

III.2.6. Ensayo Clínico Preliminar

IV. Resultados

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Referencias Bibliográficas

VIII. Anexos

VIII.1. Certificado de Especie: *Geranium dielsianum* Knut

VIII.2. Especificaciones de Excipientes

VIII.3. Técnicas Analíticas

RESUMEN

La especie Geranium dielsianum Knut "pasuchaca", crece en forma silvestre en la serranía sobre los 3 000 metros de altura. El estudio fitoquímico indica la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, mucílagos y aceites esenciales. La dosis letal 50 (LD 50) del extracto acuoso de la planta se reporta en 35 gramos/kg en ratones al ser administrados por vía peroral. Con la finalidad de uniformizar y controlar la administración de la especie G. dielsianum, se ha realizado la formulación de una forma farmacéutica sólida con un contenido de 500 mg de un extracto elaborado a escala industrial. Para esto se evaluaron las características reológicas del extracto y en función de ello se diseñaron 3 formulas preliminares: por precompresion, por granulación en lecho fluido con solvente orgánico y granulación en lecho fluido con solvente mixto. Habiéndose obtenido los mejores parámetros farmacotécnicos con la granulación con solvente mixto, se elaboraron un total de 3 lotes para evaluación de LD 50, estabilidad y estudios clínicos en fase II, para lo cuales se acondicionaron las tabletas utilizando blisters de PVDC/PVC/aluminio, obteniéndose un producto cuyos parámetros se mantienen dentro de especificaciones, luego de 30 meses de almacenamiento a condiciones normales; siendo lo más notable el ligero incremento de la humedad y peso promedio en el tiempo; el LD 50 para la tableta se determinó en 17,76 g/kg peso corporal a las 24 horas. En el estudio clínico en Fase II hubo una disminución del 17% en la glucosa sanguínea y disminución en un 48% de la hemoglobina glicosilada A1c, como indicador del efecto a largo plazo; de otro lado, con excepción de una ligera reducción en los triglicéridos, no hubieron modificaciones significativas de los parámetros bioquímicos evaluados. Se concluye que con el extracto atomizado y el procedimiento descrito puede formularse una forma farmacéutica de tabletas, las cuales cumplen los criterios de calidad y especificaciones establecidas.

Palabras clave: "Pasuchaca", Geranium dielsianum Knut, dosis letal 50, efecto hipoglicemico, diseño de tabletas

SUMMARY

The specie *Geranium dielsianum* Knut "pasuchaca" grows in wild form in the mountainous area on the 3000 meters of height. The phytochemical study indicates the presence of tannin, flavonoids, saponines, mucilages, essential oils. Lethal dose 50 of the watery extract of the plant is reported in 35 g/kg in mice to the being administered by peroral route. With the purpose of uniform and control the administration of *G. dielsianum*, has been made the formulation of a solid pharmaceutical form containing 500 mg of an elaborated extract for industrial scale. For this, the rheological characteristics of the extract were evaluated and based on it three preliminary formulas were designed: By precompression, granulation in a fluidized bed granulator using organic solvents and Granulation in fluidized bed granulator using mixed solvents. Having obtained the best pharmacotechnical parameters with the granulation using mixed solvents, a total of three lots for evaluation of LD 50, stability and phase II clinical studies were elaborated, for as the tablets were packed using blisters de PVDC/PVC/Aluminium, obtaining a product whose parameters stayed within specifications, after 30 months of storage to normal conditions, being but remarkable the slight increase of the humidity and weight average in the time. LD 50 for the tablet is 17.76 of g/kg to the 24 hours. In the fase II clinical study there was a diminution of 17% in the sanguineous Glucose and diminution of 48% of the glicosilated hemoglobin A1c, like an indicator of the long term effect, of another side, with exception of a slight reduction in the triglicerides, were no significant modifications of the evaluated biochemical parameters. It is concluding that, with the atomized extract and the described procedure, it can be formulated a pharmaceutical form of tablet, which fulfill the quality criteria and the established specifications.

Keywords: "Pasuchaca", *Geranium dielsianum* Knut, lethal doses 50, hypoglycemic effect, design and formulation of tablets

I.- INTRODUCCIÓN

La medicina a base de productos vegetales tiene gran importancia en el Perú, debido a la gran riqueza cultural de sus antepasados, quienes dejaron sus legados a través de la palabra y que, de generación en generación, han llegado hasta hoy. Cuando se trata de hechos históricos, se crean los mitos y las leyendas, pero cuando se habla de salud, se puede pensar en cura o enfermedad y tal vez la muerte. Esto obliga a que en la práctica médica se hable mucho de Medicina basada en evidencia, para contrarrestar los “mitos” creados sobre algunas especies con devastadores efectos sobre la credibilidad de sus productos; además, existen prácticas nocivas como, la administración de drogas vegetales sin especie definida y en concentraciones erráticas, lo cual no hace sino empeorar la situación de los productos vegetales con actividad terapéutica.

En este sentido, se hace necesario establecer criterios científicos para verificar las propiedades atribuidas a los vegetales y estandarizar la administración de las drogas utilizando elementos indicadores y formas farmacéuticas con eficiencia comprobada, permitiendo al médico recetar el producto natural con la confianza que su paciente obtendrá el alivio deseado y al paciente, un medicamento con garantía porque su calidad ha sido previamente verificada mediante sistemas comprobados.

Dentro de las especies que son más recomendadas se encuentra la “Pasuchaca”, debido a que ha mostrado propiedades hipoglucemiantes (1), lo cual lo convierte en una alternativa muy atractiva para millones de pacientes con Diabetes, lamentablemente bajo este nombre existen diversas especies las cuales se cultivan en diversos nichos ecológicos, y en el mercado se puede hallar las plantas enteras o bajo la forma de cápsulas de la planta pulverizada, pudiendo el paciente ser víctima de un problema de calidad o adulteración, ante esta situación la elaboración de una forma farmacéutica utilizando extractos estandarizados permite avanzar en la solución de la problemática creada por el manejo inadecuado de la riqueza medicinal natural peruana.

Por ello, al observar que la especie vegetal *Geranium dielsianum* Knut “Pasuchaca”, es utilizada popularmente, se define como objetivo la elaboración de una forma farmacéutica estandarizada que mantiene las propiedades terapéuticas de la especie y que es estable durante el periodo de uso, además, debe cumplir con los criterios de seguridad y eficacia

inherentes a un medicamento, por este motivo, se considera un estudio de toxicidad y un estudio clínico de fase II como parte de este trabajo.

II.- GENERALIDADES

II.1.- Estudio de la Especie

II.1.1.- Características de la Familia Geraniaceae (1,2)

Las especies de la familia Geraniaceae son plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perennes, con hojas sencillas esparcidas u opuestas, generalmente de nervadura palmeada y con estípulas. Habitan en todos los países del globo, sobre todo en África del Sur. Existen aproximadamente 650 especies.

II.1.2.- Características del Genero Geranium (1,2)

Este género se caracteriza por ser generalmente herbáceo, con hojas estipuladas palmado-lobuladas o sisertas, pedúnculos axilares, 1-2 flores actinomorfas, 5 sépalos y pétalos, imbricados, 5 glándulas, alternando con los pétalos. 10 estambres, libres o algo unidos en su base, ovario pentacarpelar, terminado en 5 estigmas, 2 óvulos por carpelo superpuestos, esquisocarpos uniseminados con rostro de enrollamiento en espiral, glabra en la cara anterior.

II.1.3.- Ubicación Sistemática de la especie:

Según el Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas:

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Rosidae
Orden	Geraniales
Familia	Geraniaceae
Género	Geranium
Especie	<i>Geranium dielsianum</i> Knuth
Nombres comunes	Pasuchaca, pasochaca

II.1.4.- Descripción morfológica de Geranium dielsianum Knut (1)

Planta perenne, acaule, silvestre que crece en forma espontánea, y que posee las siguientes características morfológicas:

Raíz típica o pivotante, Hojas basales pubescentes, sostenidas por peciolo (21 mm de largo), alternas palmatipartidas en 7, dentilobulada. Los lóbulos ampliamente cuneado-abovados. Los 3 lobulos de en medio tridentados, con estípulas pubescentes concrecentes. Corolino de 13 mm de largo, Inflorescencia umbela, pedúnculo floral de 10 mm de largo, Flor periántica, diclamidea, heteroclamidea, hermafrodita, actinomorfa, presenta en su base 5 verticilos de brácteas corolinas, Caliz dialisépalo, con 5 sépalos pubescentes (8 mm de largo por 2,5 mm de ancho) oblongolanceolados, Coroladialipétala de tipo rosácea, pentámera de color blanco (8 mm de largo), el pétalo presenta una uña corta y glabra entera y de forma abovada, Androceo diplostémono, con 10 estambres libres, dispuestos en 2 verticilos, el verticilo externo más corto que el interno, con anteras ditésicas (1 mm de largo por 0,5 mm de ancho) de color amarillo, dorsifijas con filamento laminar acintado, ligeramente pubescente de 5 mm de largo, Geniceo completo, Ovario súpero pubescente de forma globosa, estilo céntrico, corto pubescente, pentacrapelar, pentalocular, penatovular, con 5 ramas estigmáticas bifidas petaloide, Fruto esquizocárpico de tipo regma que procede de gineceo pluricarpelar con muchos estilos soldados entre si, pero al madurar el fruto se secara cada uno con el correspondiente carpelo.

II.1.5.- Aspectos Etnobotánicos (3,4)

Las especies conocidas popularmente como "pasuchaca", corresponden a la familia Geraniaceae, que son un grupo de plantas herbáceas o arbustivas, anuales o perennes, con hojas sencillas esparcidas u opuestas. Habitan en todos los países del mundo. En el caso de la especie *G. dielsianum*, crece en forma silvestre en la serranía sobre los 3 000 metros de altura. En el Perú *Geranium dielsianum* Knuth se ha registrado a lo largo de la cordillera de los Andes, se ha recolectado del Departamento de Ancash, provincia Wari, distrito Huacchis, poblado menor de Contadera – Santa Vilacu

El estudio fitoquímico indica la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, mucílagos, esencias. La dosis letal 50 del extracto acuoso de la planta se reporta en 35 gramos/Kg en ratones al ser administrados por vía peroral (1).

La información Etnofarmacológica de la especie, indica que es una especie utilizada para el tratamiento de la diabetes bajo la forma de cocimiento de la planta entera. De otro lado diversos estudios farmacológicos con varias especies de este género han demostrado una reducción de las concentraciones de glucosa sanguínea en animales de experimentación utilizando extractos de la planta entera de: *Geranium ayavacense* (5, 6); *G. weberbaueri* (7) *G. lechleri* (8). La especie *G. dielsianum*, no es una excepción, tal como lo demuestra el

estudio de Huaracha **(1)**, quien encuentra un efecto hipogliceminate a dosis de 5g/kg y 10 g/kg utilizando extractos acuosos y conejos aloxonizados como material biológico. Yeren **(9)** evalúa el efecto hipogliceminate haciendo comparaciones con un antidiabético sintético (glibenclamida) y una combinación de extractos acuosos de G. dielsianum con Minthostachys setosa (muña), hallando un descenso no significativo de la glucosa en G. dielsianum , pero si un valor similar a la glibenclamida luego de 4 horas cuando existe la combinación con la Muña. Yerén utiliza ratas como animales de experimentación y produce hiperglicemia mediante administración de glucosa, esta diferencia en la metodología aplicada puede ser la razón de los diferentes resultados y a la vez brindaría algunos indicios sobre un probable mecanismo de acción de los componentes hipoglicemiantes de las Geraniáceas, como lo manifiesta Talla **(5)** al indicar que el extracto actuaría estimulando la utilización de glucosa por los tejidos periféricos, estimulando de alguna forma los receptores de insulina.



Foto 1.- Geranium dielsianum Knut, Planta entera

II.2.- Formulación de tabletas

II.2.1.- Preformulación de medicamentos (10)

Cuando se desea administrar una sustancia activa, se requiere elaborar una forma farmacéutica que permita mantener bajo control la dosificación, la que debe cumplir 3 requisitos básicos: seguro, eficaz y estable, esta premisa se convierte en el marco bajo el cual el formulador deberá aplicar sus conocimientos para modificar las propiedades del activo de acuerdo a sus necesidades biofarmacéuticas, fisicoquímicas y fármacotécnicas. Por este motivo, se deben conocer previamente estas características, a esta actividad se le denomina Preformulación.

En el caso de productos de origen natural, en los que no existe una composición química definida, estos aspectos se tornan complejos, por el hecho de que no se tiene claramente definido un activo responsable, por tanto las características fisicoquímicas de la mezcla van a diferir de los de cada componente en forma individual

Por ello es conveniente el empleo de extractos estandarizados, en los cuales exista un control sobre la especie botánica y su origen, lo que permitirá reducir la variabilidad de los resultados (11, 12).

Los objetivos y consideraciones de la preformulación se resumen en la tabla N° 1

II.2.1.1 PROPIEDADES FARMACOTÉCNICAS DE LOS POLVOS:

Son aquellas a tomar en cuenta para examinar a los granulados a fin de poder prever los posibles problemas que puedan presentarse durante el proceso de compresión y los cuales brindaran información valiosa. Estas son:

II.2.1.1.1.- PROPIEDADES ESTÁTICAS

1. **DISTRIBUCIÓN GRANULOMÉTRICA:** Es un parámetro que influye tanto en las propiedades reológicas de la mezcla como en las características finales del comprimido. Está ampliamente aceptado que la granulometría más adecuada para una mezcla pulverulenta es la comprendida entre 0,25 y 1 mm, aunque una pequeña incorporación de finos reduce la porosidad y mejora la capacidad de deslizamiento (15).

Las técnicas de análisis comúnmente utilizadas son la microscopía y la tamización analítica (16, 17).

Tabla Nº 1: Objetivos y Consideraciones de la Preformulación (13, 14)	
Objetivos de la Preformulación	
<ul style="list-style-type: none"> • Mejorar características organolépticas • Protección al fármaco • Mejorar la incorporación del fármaco • Facilitar la administración de fármacos • Facilitar la correcta dosificación de fármacos • Controlar la liberación del principio activo • Distribución selectiva de fármacos - toxicidad • Elegancia • Conseguir las propiedades de un medicamento: estabilidad, seguridad y eficacia. 	
Consideraciones Biofarmaceúticas:	
<ul style="list-style-type: none"> • Biodisponibilidad • Vía de administración • Características biofarmaceúticas de la formulación 	
Características Fisicoquímicas y Farmacotécnicas	
<ul style="list-style-type: none"> • Cristalinidad y polimorfismo • Punto de fusión • Solubilidad • Fluidez • Estabilidad • Compatibilidad 	

El objetivo de dicha propiedad es evaluar el tamaño de las partículas, la distribución de los tamaños y la forma de las mismas, permitiendo una repartición estadística de sus componentes en función del tamaño de los mismos (17).

2. **DENSIDAD APARENTE sin compactación (DASC):** se define como el peso por unidad de volumen comprendido por las partículas sólidas, incluyendo los poros internos y externos; y los espacios interparticulares del polvo en un estado de emplazamiento determinado (17, 18, 19).
3. **DENSIDAD APARENTE con compactación (DACC):** es el volumen ocupado por las partículas tras la máxima reducción de esos espacios interparticulares, por acomodamiento por vibración pero aún persiste la presencia de poros internos (18,20).
4. **COMPRESIBILIDAD:** se refiere a la capacidad de un polvo o mezcla pulverulenta de formar una masa compacta al estar sometido a una presión y está en relación inversa a la fluidez. Es una relación de densidades, según la siguiente expresión (15, 17):
$$C (\%) = \frac{DACC - DASC}{DACC} \times 100$$
5. **HUMEDAD:** el contenido de humedad residual de una mezcla pulverulenta influye sobre sus propiedades reológicas como características de flujo, compresión y consolidación del granulado, por lo tanto, es un parámetro muy importante durante el proceso de compresión; y la estabilidad de sus componentes (15).

II.2.1.1.2.- PROPIEDADES DINÁMICAS: son de gran importancia debido a que la mayor parte de mezclas son sometidas a diversas operaciones en las que éstas tienen que estar puestas en movimiento.

1. **VELOCIDAD DE DESLIZAMIENTO:** la fluidez es una de las propiedades más representativas ya que en un determinado momento las partículas que lo constituyen tienen que rodar unas sobre otras para permitir la mezcla, por tanto es dependiente de la forma y tamaño de sus partículas, la distribución granulométrica, la densidad y

la humedad del producto. Determina el posterior rendimiento de la máquina de comprimir **(15, 18, 21)**.

2. **ÁNGULO DE REPOSO:** propiedad intrínseca de cualquier polvo o mezcla que se traduce en una resistencia a un movimiento diferencial cuando las partículas son sometidas a fuerzas externas **(18)**.

Se refiere al ángulo que forma la pendiente del cono de granulado con el plano horizontal sobre el cual se apoya. **(15)** y es indicativo de la fricción interparticular

Para determinar el ángulo de reposo se utiliza la siguiente expresión:

$$\alpha = \arctg h / r$$

donde: $h = altura$

$r = radio$

II.2.2.- Componentes de la tableta (22)

El formulador debe evitar en lo posible el empleo de excipientes, pero cuando las características del activo no satisfacen las necesidades mencionadas anteriormente, se deben utilizar sustancias que modifiquen estas propiedades. Estas sustancias son los excipientes y como característica común se encuentra su inercia Química y Farmacológica, por ejemplo:

- Diluyentes
- Desintegrantes
- Aglutinantes
- Lubricantes

II.2.3.- Métodos de fabricación (15, 23)

Una tableta se obtiene por la compactación de un granulado, por ello, es dependiente de las propiedades del granulado, las cuales son:

- Fluidez
- Compactabilidad

Para la obtención del granulado existen 3 métodos reconocidos cuyo resumen de características se encuentra en la Tabla N° 2:

Tabla Nº 2.- Comparación de las características de los 3 tipos de granulación		
Granulación húmeda	Granulación seca	Mezcla directa
Nº de Operaciones		
Tamizado/molienda	Tamizado/molienda	Tamizado/molienda
Mezcla	Mezcla	Mezcla
Preparación aglutinante	Precompresión	
Amasado	Granulación seca	
Granulación húmeda	Lubricación	
Secado		
Granulación seca		
Lubricación		
Ventajas		
<ul style="list-style-type: none">- Permite el empleo de sustancias higroscópicas y delicuescentes- Se recomienda para conseguir buena uniformidad con principios activos cuya proporción es menor de 1%- Se obtienen gránulos más densos y homogéneos- Se puede utilizar solventes orgánicos- No depende de las propiedades de compactación y flujo del activo	<ul style="list-style-type: none">- Permite trabajar con sustancias sensibles a la temperatura o al agua- Dependiendo del equipo (granuladores de cilindro), pueden ser métodos rápidos- Requiere menores equipos que la granulación húmeda	<ul style="list-style-type: none">- Es muy rápida- Consume poca energía- No requiere equipos complejos
Desventajas		
<ul style="list-style-type: none">- Requiere numerosas operaciones- Relativamente lento- Requiere equipos numerosos y complejos- Generalmente no se pueden procesar productos sensibles a la temperatura y la humedad- Requiere mayor infraestructura- Consume mayor energía	<ul style="list-style-type: none">- Produce excesivo polvo fino que tiene que ser compactado nuevamente- Requiere equipos adicionales- Depende de las propiedades de Compactación y flujo de las sustancias	<p>Depende de las propiedades de Compactación y flujo de las sustancias, incluyendo excipientes</p> <p>Generalmente utiliza excipientes especiales que son mas caros</p> <p>Difícil de reprocesar, porque muchas sustancias pierden compresibilidad</p> <p>No se consigue buena uniformidad de contenido cuando se utilizan drogas en baja proporción</p>

II.2.4.- Control de la calidad de las tabletas

Las características de las tabletas de productos botánicos se controlan mediante las siguientes pruebas:

II.2.4.1.- Aspecto

II.2.4.2.- Peso Promedio

II.2.4.3.- Dureza

II.2.4.4.- Friabilidad

II.2.4.5.- Disgregación

II.2.4.6.- Identidad de principio activo

II.2.4.8.- Pruebas Microbiológicas (24).

La Tabla N° 3, muestra los límites que establece la USP 29 para los “Suplementos Dietéticos”.

Tabla N° 3: Límites microbianos según la USP para Suplementos dietéticos

MATERIAL	Límites microbianos requeridos (ufc/g)
Extractos botánicos en polvo	Nivel microbiano aeróbico total: NMT 10^4
	Levaduras combinadas totales y nivel de hongos: NMT 10^3
	Ausencia de <i>Salmonella spp</i> en 10g
	Ausencia de <i>E. coli</i> en 10 g
Otras materias primas e ingredientes de suplementos dietéticos	Nivel microbiano aeróbico total: NMT 10^3
	Levaduras combinadas totales y nivel de hongos: NMT 10^2
	Ausencia de <i>Salmonella spp</i> en 10g
	Ausencia de <i>E. coli</i> en 10 g

II.2.5.- Estudios de Estabilidad

El propósito de la prueba de estabilidad es proporcionar evidencia de cómo la calidad de un principio activo o medicamento varía con el tiempo bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como: temperatura, humedad y luz ambiental. Establecer un período de vida media y las condiciones de almacenamiento recomendadas (24, 25, 26).

II.5.1 Estudios de estabilidad a largo plazo

Aplicables a *estudios de estabilidad* de rutina, se realizan bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas para el producto. Su tiempo de duración es mínimo

12 meses y debe ser continuada por un período de tiempo suficiente para estimar su tiempo de vida de almacenamiento.

* En la segunda revisión de la guía de la ICH Q1 AR se propone como condición de almacenamiento alternativa en los estudios de estabilidad a largo plazo: $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $65\text{ \% HR} \pm 5\text{ \% HR}$, con la finalidad de que los resultados obtenidos puedan garantizar la estabilidad del principio activo o medicamento conservado en cualquier región climática del mundo (16, 25).

II.5.2 Estudios de estabilidad acelerada

Estudios diseñados para incrementar la tasa de degradación química y de alteración física de un medicamento sometiénolo a condiciones de almacenamiento muy severas como parte de un estudio de estabilidad establecido. Los datos de estos estudios, en conjunto con los datos de los estudios a largo plazo, pueden ser usados para estimar los efectos químicos a mayor largo plazo a condiciones no aceleradas y evaluar el efecto a corto plazo que podría ocurrir durante el embarque, por ejemplo y apoyar extrapolaciones de estabilidad en las condiciones de conservación propuestas (16, 25, 26).

II.5.3 Estudios de estabilidad intermedia

Estudios diseñados para incrementar moderadamente la tasa de degradación química y de alteración física de un medicamento para ser almacenado a largo plazo a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos estudios se realizan sí, durante el transcurso de los estudios de estabilidad acelerados (a los seis meses), se producen cambios significativos en el medicamento (16, 25, 26).

Las condiciones de almacenamiento de las muestras para cada uno de los estudios son mostradas en la Tabla N° 4.

Tabla N° 4: Condiciones de almacenamiento para estudios de estabilidad

Estudio	Condiciones de almacenamiento	Período mínimo de tiempo
Estabilidad a largo plazo	25 °C \pm 2 °C / 60 % HR \pm 5 % HR 30 °C \pm 2 °C / 65 % HR \pm 5 % HR *	12 meses
Estabilidad intermedia	30 °C \pm 2 °C / 60 % HR \pm 5 % HR	6 meses
Estabilidad acelerada	40 °C \pm 2 °C / 75 % HR \pm 5 % HR	6 meses

Fuente FDA (25)

Se define como “*un cambio significativo*” en condiciones aceleradas para un medicamento:

- ❖ Si en los resultados finales hay una disminución igual al 5 % del contenido inicial en principio activo.
- ❖ Si se excede el límite especificado de compuestos de degradación para un producto.
- ❖ Cuando se ven afectadas las propiedades físicas y aspecto del medicamento, como el color, separación de fases, la dureza, resuspensión, etc.
- ❖ Cuando el pH del producto se encuentra fuera de especificaciones.
- ❖ Cuando los resultados de la prueba de disolución de comprimidos se encuentran fuera de especificaciones (24).

II.2.6.- Estudios clínicos (14)

Son investigaciones científicamente planeadas en grupos de humanos, están diseñadas para probar la seguridad y eficacia de algún tratamiento medico, procedimiento o material utilizado en diagnóstico, profilaxis o terapia.

Usualmente se llevan a cabo en 4 fases:

Estudios de Fase I

Estudios de Fase II

Estudios de Fase III

Estudios de Fase IV

III. Materiales y Metodos

III.1.Materiales, reactivos, equipos y servicios

III.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS

- Diluyente soluble
- Diluyente insoluble
- Lubricante orgánico
- Lubricante inorgánico
- Disgregante
- Aglutinante
- Solvente orgánico
- Solvente acuoso

III.1.2. EQUIPOS

III.1.2.1. Equipos e instrumentos

- Reactor de extracción de 100 litros con agitación dinámica.
- Equipo Spray Dryer Thermex – Fitofarma de 40 litros/hora: atomizador a gas con plato rotante.
- Tamices
- Equipo de lecho fluido
- Mezclador V
- Tableteadora con punzones oblongos de 20 x 10
- Equipo friabilizador
- Equipo desintegrador
- Durómetro Erweka
- HPLC Merck con sistema de arreglo de diodos
- Balanza analítica
- Balanza peso medio

III.1.3. SERVICIOS Y EVALUACIONES EXTERNAS

- Estudio de toxicidad: Universidad Peruana Cayetano Heredia
- Estudio clínico Fase II: Facultad de Medicina de la UNMSM

III.2.Procedimiento Experimental

III.2.1. Obtención del extracto: se realizó en la planta de Laboratorios Fitofarma, para lo cual se utilizaron las siguientes operaciones:

Recolección:

La planta fue colectada en la provincia de Wari, departamento de Ancash a altura aproximada de 3 000 msnm.

Maceración:

Se maceró 3 % de planta en 97% de mezcla hidroalcohólica al 60%, a temperatura ambiente y por 3 días.

Filtración:

Se filtró utilizando un filtro manga de lona

Secado:

Se utilizó el Spray Dryer y maltodextrina (30% del extracto seco) como sistema carrier, obteniéndose un polvo marrón muy fino.

Tamizado:

Se utilizó una malla N° 100

Envasado:

Se envasó en bolsas de polietileno, las cuales se sellaron con calor, y luego se identificaron con un rotulo adecuado.

III.2.2. Análisis del extracto

Tabla N° 5: Pruebas y referencias de los métodos utilizados en el análisis del extracto

PRUEBA	MÉTODO	REFERENCIA
Aspecto	Propio	Anexo IX.3.1
Pérdida por secado	Oficial	USP 29
Identidad	Propio	Anexo IX.3.3
pH de la solución	Propio	Anexo IX.3.4
Residuo de ignición	Oficial	USP 29
Metales pesados	Oficial	OMS
Tamaño de partícula	Propio	Anexo IX.3.5
Límite microbiano	Oficial	USP 29

III.2.3. Formulación de la tableta

III.2.3.1. Formulación preliminar

III.2.3.1.1. ENSAYOS DE LAS PROPIEDADES ESTÁTICAS DEL EXTRACTO

Tabla Nº 6: Ensayos de las propiedades estáticas del extracto

PRUEBA	METODO	REFERENCIA
Tamaño de partícula	Propio	Anexo IX.3.5
Densidad aparente s/c	Propio	Anexo IX.3.6
Densidad aparente c/c	Propio	Anexo IX.3.7
Compresibilidad	Propio	Anexo IX.3.8
Pérdida por Secado	Oficial	USP 29

III.2.3.1.2. ENSAYOS DE LAS PROPIEDADES DINÁMICAS DEL EXTRACTO

Tabla Nº 7: Ensayos de las propiedades dinámicas del extracto

PRUEBA	MÉTODO	REFERENCIA
Ángulo de reposo	Propio	Anexo IX.3.9
Velocidad de flujo	Propio	Anexo IX.3.10

III.2.3.1.3. DESCRIPCIÓN DE LAS FÓRMULAS PRELIMINARES

Con los resultados de las pruebas estáticas y dinámicas, se decidió probar la granulación seca y la granulación húmeda, para lo cual se desarrollaron 3 formulaciones cuyos componentes sólidos no difieren. Adicionalmente, con el fin de evaluar el comportamiento por separado de cada tipo de solvente en una mezcla, se utilizaron 2 tipos de sistemas. Por la capacidad del equipo granulador de lecho fluido”, fue necesario hacer pruebas de 20 000 tabletas en las granulaciones húmedas y de 5 000 tabletas en las pruebas de granulación seca o pre-compresión. Las formulaciones se detallan en la Tabla Nº 8:



Foto 2.- Balanza digital y equipo para medir ángulo de reposo



Foto 3.- Equipo granulador de lecho fluido (Desmontado para limpieza)

Tabla N° 8: Fórmulas preliminares utilizadas en las tabletas (*)

Descripción de materias primas	FORMULAS POR TABLETA		
	A	B	C
Método de Fabricación	Doble compresión	Lecho fluido	Lecho fluido
Extracto seco atomizado de <i>G. Dielsianum</i>	500,00 mg	500,00 mg	500,00 mg
Diluyente insoluble	A mg	B mg	B mg
Diluyente soluble	--	C mg	C mg
Disgregante	--	D mg	D mg
Lubricante orgánico	--	E mg	E mg
Lubricante inorgánico	F mg	G mg	G mg
Glidante	H mg	I mg	I mg
Aglutinante	--	J mg	J mg
Solvente orgánico	--	K mg	L mg
Solvente acuoso	--	--	M mg
Total sólidos	720,00 mg	720,00 mg	720,00 mg

(*) Formulas expresadas como letras por confidencialidad

III.2.3.1.4. PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE LAS FÓRMULAS PRELIMINARES:

Granulación seca:

FÓRMULA A: PROCEDIMIENTO PARA 5 000 TABLETAS

1.- Tamizado

Se tamizó por malla N° 20 en el siguiente orden:

Extracto de *G. dielsianum* 2,500 kg

Diluyente Insoluble (1/2) A/2 kg

2.- Se tamizó por malla N° 60

Lubricante inorgánico (1/2) F/2 kg

3.- **Mezcla**

Se añadió y mezcló por 10 minutos en el mezclador rotacubo

Erweka:

Polvos tamizados en paso N° 01 X kg

Polvos tamizados en paso N° 02 Y kg

Z kg

4.- **Precompresion**

Se comprimió en:

Tableteadora rotativa

Tableta: cóncava, diámetro 7 mm sin ranura.

N° de punzones: 12

Velocidad de compresión: 23 rpm

5.- **Granulación seca**

Se granuló por malla N° 16

6.- **Tamizado**

Se tamizó por malla N° 60 por separado:

Lubricante inorgánico (2/2) F/2 kg

Glidante H kg

7.- **Mezcla final**

Se añadió al mezclador y se mezcló por 2 minutos:

Granulado del paso N° 05 Z kg

Polvos tamizados en paso N° 06

Diluyente insoluble (2/2) A/2 kg

3,600 kg

8.- **Compresión**

Se comprimió en:

Tableteadora rotativa

Tableta: cóncava, diámetro 7 mm sin ranura.

N° de punzones: 12

Velocidad de compresión: 23 rpm

Granulación húmeda

FÓRMULA B: PROCEDIMIENTO PARA 20 000 TABLETAS

SOLUCIÓN GRANULADORA

1. En un recipiente adecuado se disolvieron:

Solvente orgánico K kg

Aglutinante J kg

2. Se procedió de la siguiente manera: se granuló en el equipo Glatt, incorporando en el siguiente orden:

Extracto de G. dielsianum 10,000 kg

Se inyectó: solución granuladora

SECADO

3. Se secó entre 45 °C a 70 °C por 10 minutos.

TAMIZADO

4. Se tamizó por malla N° 20:

Granulado obtenido en el secado

5. Se tamizaron por separado a través de una malla N° 60:

Glidante I kg

Lubricante orgánico E kg

Lubricante inorgánico G kg

MEZCLA

6. Se colocaron en mezclador en V y se mezcló por 45 minutos

Granulado seco X kg

Disgregante D kg

Polvos tamizados (paso 6)

Diluyente insoluble B kg

Diluyente soluble C kg

7. Se colocó el granulado en bolsas de polietileno limpias, colocadas en un tambor de plástico limpio e identificado. Se cerraron herméticamente las bolsas.

TABLETEADO

EQUIPO: tableteadora rotativa

PUNZONES: 20 mm de diámetro, con una ranura

8. Con la aprobación del granulado se comprimió según los siguientes parámetros:

Aspecto: tabletas de color marrón oscuro con puntos blancos de 20 mm de diámetro, con ranura.

Peso: 720 mg + 5 %

Dureza: 6 Kp. – 30 kp

Desintegración: máximo 90 minutos.

Friabilidad: máximo 1 %

9. Se colocaron las tabletas despolvadas en bolsas de polietileno limpias, colocadas en tambores de plástico limpio e identificado. Se cerraron las bolsas herméticamente.

FÓRMULA C: PROCEDIMIENTO PARA 20 000 TABLETAS

SOLUCIÓN GRANULADORA

1. En un recipiente adecuado se disolvieron:

Solvente orgánico(parcial 1/2) L (60%) kg

Aglutinante J kg

SOLVENTE MIXTO

2. En un recipiente adecuado se mezclaron:

Solvente acuoso M kg

Solvente orgánico (parcial 2/2) L(40%) kg

3. Se procedió de la siguiente manera: Se granularon en el equipo Glatt, incorporando en el siguiente orden:

Extracto de G. dielsianum 10,000 kg

Se inyectó: solución granuladora

Solvente mixto

SECADO

4. Se secó entre 45 °C a 70 °C por 10 minutos.

TAMIZADO

5. Se tamizó por malla N° 20:

Granulado obtenido durante el secado

6. Se tamizaron por separado a través de una malla N° 60:

Glidante I kg

Lubricante orgánico E kg

Lubricante inorgánico G kg

MEZCLA

7. Se colocó en el mezclador en V, y se mezcló por 45 minutos

Granulado seco

Disgregante D kg

Polvos tamizados (paso 6)

Diluyente insoluble B kg

Diluyente soluble C kg

14,400 kg

8. Se colocó el granulado en bolsas de polietileno limpias, colocadas en un tambor de plástico limpio e identificado. Se cerraron herméticamente las bolsas.

TABLETEADO

EQUIPO: tableteadora rotativa

PUNZONES: 20 mm de diámetro, con una ranura

9. Con la aprobación del granulado se comprimió según los siguientes parámetros:

Aspecto: tabletas de color marrón oscuro con puntos blancos de 20 mm de diámetro, con ranura.

Peso: 720 mg + 5 %

Dureza: 6 Kp. – 30 kp

Desintegración: máximo 90 minutos.

Friabilidad: máximo 1 %

10. Se colocaron las tabletas despolvadas en bolsas de polietileno limpias, colocadas en tambores de plástico limpio e identificado. Se cerraron las bolsas herméticamente.

III.2.3.1.5. ENSAYOS REALIZADOS AL GRANULADO DE LAS FORMULACIONES PRELIMINARES

Tabla N° 9: Ensayos realizados al granulado de las formulaciones preliminares

PRUEBA	METODO	REFERENCIA
Aspecto	Propio	Anexo IX.3.1
Perdida por secado	Oficial	USP 29

III.2.3.1.6. ENSAYOS REALIZADOS EN LA FASE DE COMPRESIÓN

Tabla N° 10: Ensayos realizados al granulado en la fase de compresión

PRUEBA	METODO	REFERENCIA
Aspecto	Propio	Anexo IX.3.1
Uniformidad de peso	Oficial	USP 29
Dureza	Propio	Anexo IX.3.11
Friabilidad	Oficial	USP 29
Disgregación	Propio	Anexo IX.3.12
Identidad	Propio	Anexo IX.3.3
Cuantificación	Propio	Anexo IX.3.13
Limite microbiano	Oficial	USP 29

III.2.3.2. FORMULACIÓN DEFINITIVA:

Con los resultados de las pruebas preliminares, se elaboraron 2 lotes adicionales de la formulación C (ver III.2.3.1.3 Formula C).

III.2.3.2.1. PROCEDIMIENTO DE FABRICACIÓN DE LA FÓRMULA DEFINITIVA: (ver III.2.3.1.4 – Formula C)

III.2.3.2.2. ENSAYOS REALIZADO AL GRANULADO DE LA FORMULACIÓN DEFINITIVA

Tabla N° 11: Ensayos realizados al granulado en la formulación definitiva

PRUEBA	METODO	REFERENCIA
Aspecto	Propio	Anexo IX.3.1
Perdida por secado	Oficial	USP 29

III.2.3.2.3. ENSAYOS REALIZADOS EN LA FASE DE COMPRESIÓN

Tabla N° 12: Ensayos realizados al granulado en la fase de compresión

PRUEBA	MÉTODO	REFERENCIA
Aspecto	Propio	Anexo IX.3.1
Uniformidad de peso	Oficial	USP 29
Dureza	Propio	Anexo IX.3.11
Friabilidad	Oficial	USP 29
Disgregación	Propio	Anexo IX.3.12
Identidad	Propio	Anexo IX.3.3
Límite microbiano	Oficial	USP 29

III.2.4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD (25)

Las muestras emblistradas de la formula definitiva, se sometieron al estudio de estabilidad a condiciones normales de almacenamiento (25°C 60% HR) según la Normativa ICH vigente al inicio del estudio, por un periodo de 30 meses.

III.2.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA (27)

Se han efectuado estudios de toxicidad aguda de las tabletas elaboradas en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, utilizando ratones albinos machos (Mus musculus), cepas Balb C de 18 a 22 g de peso, administrando extracto acuoso por vía oral mediante sonda metálica luego de un ayuno de 14 horas; La muestra se dividió en once grupos de cinco ratones cada uno, La mortalidad fue observada a las 24, 48 y 72 horas, sobre cuyos resultados se practicaron los cálculos estadísticos a fin de determinar la DL50.

III.2.6. ESTUDIO CLÍNICO FASE II (28)

El ensayo clínico fue realizado en la Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos mediante un convenio con Laboratorios Hersil. Se determinó la eficacia y seguridad del extracto hidroalcohólico de *Geranium dielsianum* Knuth en pacientes intolerantes a la glucosa. Se utilizó el extracto en forma de tabletas de 500 mg, con cuatro niveles de dosificación (250 mg c/8 h por 45 días; 500 mg c/8 h por 45 días; 500 mg c/8 por 90 días; 1000 mg c/8 h por 45 días), aplicado en 80 pacientes con diagnóstico de intolerantes a la glucosa, según los criterios del Consenso Internacional de 1997; los pacientes se dividieron en cuatro grupos de 20 cada uno, recibiendo cada grupo un nivel de dosificación. Al inicio y término del tratamiento se realizaron los respectivos exámenes bioquímicos y hematológicos de control. Ingresaron voluntariamente al programa de investigación 89 pacientes, concluyéndolo 80 (9 abandonaron el estudio).

IV. RESULTADOS

IV.1. Obtención del extracto

Partiendo de 7 kg de Planta entera desecada y 300 g de maltodextrina como Carrier, se obtuvo 1 kg de extracto en polvo. El proceso se llevó a cabo de acuerdo a los parámetros establecidos.

IV.2. Análisis del extracto

(Ver Protocolo analítico: Tabla N° 13)

IV.3. Formulación

IV.3.1. Propiedades estáticas del extracto (Ver Tabla N° 14)

IV.3.2. Propiedades dinámicas del extracto (Ver Tabla N° 15)

IV.3.3. Formulación de la tableta

IV.3.3.1. Formulación preliminar

IV.3.3.1.1. Granulado

IV.3.3.1.1.1. Aspecto (Ver Tabla N° 16)

IV.3.3.1.1.2. Humedad (Ver Tabla N° 16)

IV.3.3.1.2. Tableta

IV.3.3.1.2.1. Aspecto (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.2. Uniformidad de peso (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.3. Dureza (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.4. Friabilidad (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.5. Identidad (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.6. Humedad (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.1.2.7. Disgregación (Ver Tabla N° 17)

IV.3.3.2. Fórmula definitiva

IV.3.3.2.1. Granulado

IV.3.3.2.1.1. Aspecto (Ver Tabla N° 18)

IV.3.3.2.1.2. Humedad (Ver Tabla N° 18)

IV.3.3.2.2. Tableta

IV.3.3.2.2.1. Aspecto (Ver Tabla N° 19)

IV.3.3.2.2.2. Uniformidad de peso (Ver Tabla N° 19)

IV.3.3.2.2.3. Dureza (Ver Tabla N° 19)

IV.3.3.2.2.4. Friabilidad (Ver Tabla N° 19)

IV.3.3.2.2.5. Identidad (Ver Tabla N° 19)

- IV.3.3.2.2.6. Humedad (Ver Tabla N° 19)
- IV.3.3.2.2.7. Disgregación (Ver Tabla N° 19)
- IV.3.3.2.2.8. Recuento microbiano (Ver Tabla N° 19)
- IV.4. Estudio de estabilidad (ver Tabla N° 20)

Luego de 30 meses de almacenamiento a condiciones normales, se observa un ligero incremento de la humedad y peso promedio, sin escapar de sus especificaciones
- IV.5. Estudio de toxicidad (27)

Los resultados se muestran en la Tabla N° 21.
- IV.6. Estudio clínico fase II (28)

Los resultados emitidos se muestran en las Tablas N° 22, 23 y 24.

Se observó una reducción de 17% de los valores de la glucosa sanguínea, al utilizar 500 mg c/8 h por 45 días ($p < 0.0001$) y disminución en los valores de hemoglobina glicosilada A1c; los otros datos bioquímicos fluctuaron dentro de los límites normales permitidos.

Tabla N° 13: Protocolo de análisis del extracto de G. dielsianum "Pasuchaca"

CARACTERÍSTICA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
<u>LOTE</u>	N.A.	0017190
<u>ESPECIE BOTÁNICA:</u>	<u>Geranium dielsianum Knut</u>	Conforme
<u>ASPECTO</u>	Polvo homogéneo de color marrón.	Conforme
<u>SOLUBILIDAD</u>	Soluble en agua y en etanol.	Conforme
<u>IDENTIFICACIÓN</u>	Positivo	Positivo
Cromatografía en capa fina		
<u>PÉRDIDA POR SECADO</u>	Máximo 5%	4%
(105°C por 2 horas)		
<u>RESIDUO DE IGNICIÓN</u>	Máximo 1%	0,4%
<u>pH</u> (So. 1% en agua)	4.0 – 5.0	4,3
<u>METALES PESADOS</u>	Máximo 10 ppm	menor de 1 ppm
(Método II USP)		
<u>TAMAÑO DE PARTICULA (*)</u>	Pasa tamiz N° 30 > 98%	100%
	Pasa tamiz N° 60 > 80%	93%
	Pasa tamiz N° 100 > 50%	67%
<u>LÍMITE MICROBIANO</u>		
Recuento bacteriano	100 UFC / g	menor de 10 ufc/g
Recuento de hongos y levaduras	20 UFC / g	menor de 10 ufc/g
<u>Salmonella sp.</u>	Ausente	ausente
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	Ausente	ausente
<u>E. coli</u>	Ausente	ausente
<u>Staphylococcus aureus</u>	Ausente	ausente
Coliformes	<10 UFC/g	menor de 3 ufc/g

Tabla N° 14: Rango de tamaño de partículas del extracto atomizado de Pasuchaca

Mallas	Diámetro (um)	% Retenido	% Acumulado	% Atraviesa
40	425	0,008	0,008	99,992
60	250	0,125	0,133	99,867
100	150	2,365	2,499	97,501
200	75	14,098	16,596	83,404
270	53	14,282	30,878	69,122
base	0	69,122	100,000	0,000
Total		100,000		

Grafico N° 1: Rango de tamaño de partículas del extracto atomizado de Pasuchaca

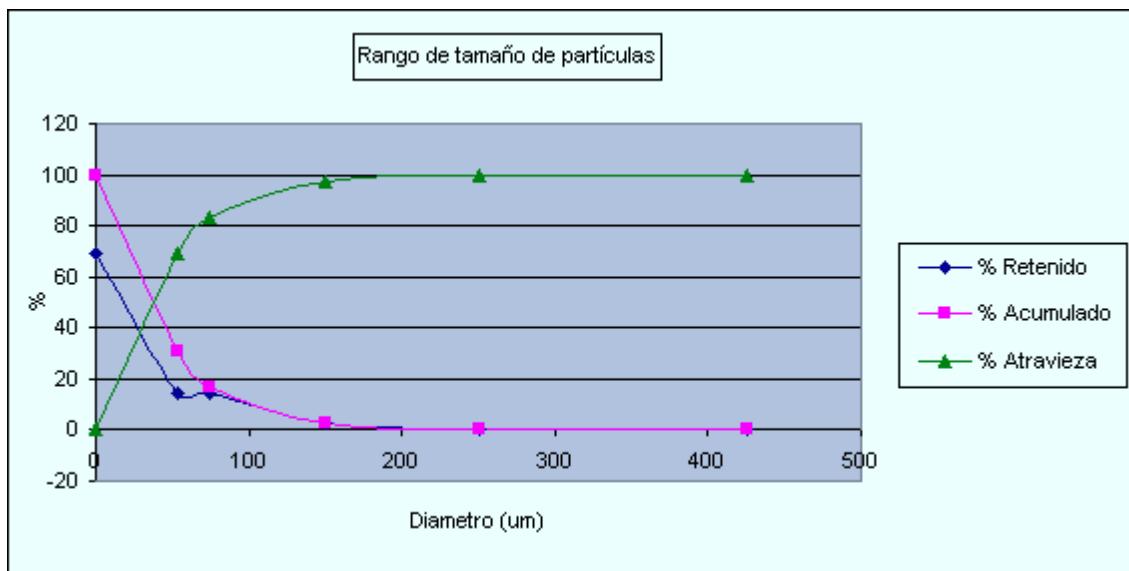


Tabla N° 15: Propiedades estáticas y dinámicas del extracto

PRUEBA	MÉTODO	RESULTADOS
Densidad aparente c/c	Propio	71 g/100 ml
Densidad aparente s/c	Propio	43 g/100 ml
Compresibilidad	Propio	39,40%
Perdida por secado	Oficial	4%
Angulo de reposo	Propio	> 90°
Velocidad de flujo	Propio	No fluye

Tabla N° 16: RESULTADOS ANALÍTICOS DEL GRANULADO DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

Característica	Especificaciones	FÓRMULAS PRELIMINARES		
		A	B	C
Aspecto	Granulado marrón, moteado con partículas amarillentas	Conforme	Conforme	Conforme
Perdida por secado	Máximo 15%	2%	2,5%	2,7%

Tabla N° 17: RESULTADOS ANALÍTICOS DE LAS TABLETAS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

Característica	Especificaciones	FÓRMULAS PRELIMINARES		
		A	B	C
Aspecto	Tabletas marrones, ligeramente moteadas de forma oblonga	Tabletas marrones, ligeramente moteadas de forma oblonga, que se quiebran fácilmente	Tabletas marrones, ligeramente moteadas de forma oblonga, superficie no homogénea, signos de adhesión al punzón	Conforme
Peso promedio	720 mg + 5% (684 mg - 756 mg)	720,83	704,97	697,97
Desviación estándar		20,98	18,49	13,02
Perdida por secado	Máximo 15%	2%	2,3%	2,5%
Dureza	6 kp - 30 kp	Menor de 3	8,3 kp - 12,2 kp	16,11 kp - 21,81 kp
Friabilidad	Menor de 1%	No cumple	0,92	0,039
Disgregación	Máximo 90 minutos (en agua)	No se realizó	No se realizó	38' - 45'
Identidad	Positivo	No se realizó	No se realizó	Positivo
Limite microbiano				
Recuento total	Menor de 3000 ufc/g	No se realizó	No se realizó	menor de 10
Hongos y levaduras	Menor de 300 ufc/g	No se realizó	No se realizó	menor de 10
<u>Salmonella sp</u>	Ausencia	No se realizó	No se realizó	Ausencia
<u>Staphylococcus. Aureus</u>	Ausencia	No se realizó	No se realizó	Ausencia
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	Ausencia	No se realizó	No se realizó	Ausencia
<u>Escherichia coli</u>	Ausencia	No se realizó	No se realizó	Ausencia

Tabla N° 18: RESULTADOS ANALÍTICOS DEL GRANULADO DE LAS PRUEBAS FINALES

Características	Especificaciones	FÓRMULAS DEFINITIVAS		
		Lote 01	Lote 02	Lote 03
Aspecto	Granulado marrón, moteado con partículas amarillentas	Conforme	Conforme	Conforme
Humedad	Máximo 15%	2,7%	4,5%	2,2%

Tabla N° 19: RESULTADOS ANALÍTICOS DE LAS TABLETAS DE LAS PRUEBAS FINALES

Características	Especificaciones	FÓRMULAS DEFINITIVAS		
		Lote 01	Lote 02	Lote 03
Aspecto	Tabletas marrones, ligeramente moteadas de forma oblonga	Conforme	Conforme	Conforme
Peso promedio	720 mg + 5% (684 mg - 756 mg)	697,97	698,1	715,5
Desviación estándar		13,02	15,47	10,78
Perdida por secado	Máximo 15%	2,5%	4,7%	2,4%
Dureza	6 kp - 30 kp	16,11 kp - 21,81 kp	15,9 kp - 20,8 kp	11,21 kp - 13,97 kp
Friabilidad	Menor de 1%	0,039	0,21	0,13
Disgregación	Máximo 90 minutos (en agua)	38' - 45'	37' - 41'	25' - 28'
Identidad (Flavonoides)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Límite microbiano				
Recuento total	Menor de 3000 ufc/g	menor de 10	menor de 10	menor de 10
Hongos y levaduras	Menor de 300 ufc/g	menor de 10	menor de 10	menor de 10
<u>Salmonella sp</u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u>Staphylococcus Aureus</u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<u>Escherichia coli</u>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY

Feb 2019 Feb 2019 Feb 2019 Feb 2019

File **100** **Colombia** **2000**

RENT (199) **RENT** **RENT**

[illegible]

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY

Feb **Early's Market** **March** **Black**

File # 102 **Collected by** 2010

Photo 192 **Photo 193** **Photo 194**

[illegible]

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

Feb 2018 **Feb 2018** **Feb 2018** **Feb 2018**

Re US Columbia 2010

Page 20 **Page 21** **Page 22**

[illegible]

Tabla N° 21.1: Mortalidad según dosificación y peso corporal

g/kg ratón	Mortalidad		
	24 h	48 h	72 h
2	0/5	0/5	0/5
3,4	0/5	0/5	0/5
5,78	0/5	0/5	0/5
9,83	0/5	0/5	0/5
12,52	0/5	0/5	0/5
14,59	0/5	0/5	0/5
16,7	1/5	1/5	1/5
16,85	1/5	2/5	2/5
16,9	2/5	2/5	3/5
17	2/5	2/5	2/5
18,39	3/5	4/5	5/5

Tabla N° 21.2: DL50 a diversas horas

g/kg ratón	Mortalidad		
	24 h	48 h	72 h
DL50	<u>17,7636</u>	<u>17,3142</u>	<u>16,9724</u>
Límite inferior	16,7306	16,7025	16,6746
Límite superior	18,8604	17,9483	17,2755

Tabla N° 22: Efecto de Pasuchaca tabletas en parámetros de pacientes intolerantes a la glucosa

Tratamiento	1	2	3	Valores normales	Unidades	Valores de sujetos con intolerancia a la glucosa (34)	
	Basal	500 mg c/8 h x 45 días	500 mg c/8 h x 90 días			Obj. Control	Intens. intervenciones
n	20	20	20				
Glucosa	118,1 ± 0,5	95,7 ± 1,6	97,7 ± 2,2	70 - 105	mg/100 mL	90 - 130	> 130
Hb A1	9,9 ± 0,9	4,8 ± 0,2	4,7 ± 0,2	5,6 - 7,5	%	< 7	> 8
Albúmina	4,2 ± 0,1	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,1	3,5 - 5	g/100 mL	N.D	N.D
Proteínas	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1	6 - 8	g/100 mL	N.D	N.D

Valores medios ± error standard

Tabla N° 23: Efecto de Pasuchaca tabletas sobre el perfil lipídico de pacientes intolerantes a la glucosa

Tratamiento	1	2	3	Valores normales	Unidades	Valores de sujetos con intolerancia a la glucosa (34)	
	Basal	500 mg c/8 h x 45 días	500 mg c/8 h x 90 días			Obj. Control	Intens. intervenciones
n	20	20	20				
Colesterol	199,1 ± 3,4	184,2 ± 5,1	202,1 ± 3,8	140 - 220	mg/100 mL	< 185	> 230
Triglicéridos	172,2 ± 5,0	158,8 ± 7,6	172,3 ± 7,1	40 - 170	mg/100 mL	< 150	> 200
HDL	41,7 ± 0,6	44,0 ± 0,7	42,6 ± 0,6	>55	mg/100 mL	> 40 (V) y > 50 (M)	< 35

Valores medios ± error standard

Tabla N° 24: Efecto de Pasuchaca tabletas sobre perfiles bioquímicos de pacientes intolerantes a la glucosa

Tratamiento	1	2	3	Valores normales	Unidades
	Basal	500 mg c/8 h x 45 días	500 mg c/8 h x 90 días		
n	20	20	20		
TGO	22,3 ± 1,1	26,1 ± 1,8	32,1 ± 2,0	10 - 40	U Karmen/ mL
TGP	29,7 ± 1,3	39,6 ± 1,4	39,0 ± 2,0	10 - 40	U Karmen/ mL
Urea	20,9 ± 1,4	24,1 ± 1,0	27,1 ± 0,9	20 - 40	mg/100 mL
Creatinina	1,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0.5 - 1.3	mg/100 mL
Fosfatasa alcalina	215,1 ± 4,4	214,2 ± 6,0	234,5 ± 5,5		U/litro

Valores medios ± error standard

V. DISCUSIÓN

V.1. Obtención del extracto

La obtención del extracto se realizó utilizando una metodología industrial diseñada para que el producto final tuviera el menor tiempo posible de calentamiento y a temperaturas relativamente bajas en comparación a otras metodologías (secado en estufa o túnel de secado). De otro lado, se buscó la eficiencia del proceso, por cuanto existen otros métodos menos drásticos, que implican equipos muy sofisticados y procesos más complejos y lentos (Liofilización) (11, 12).

V.2. Análisis

El análisis del extracto indica que este cumple con los criterios de estabilidad atribuidos. Dentro de las especificaciones y basados en las recomendaciones de la OMS (29), se han colocado características que permiten controlar los aspectos de:

- Identidad : seguridad que se trata de la especie objetivo, para ello se diseñó una técnica analítica por CCF, basado en la presencia de Flavonoides que tienen una característica especial de comportamiento frente a la luz UV de longitud de onda de 365 nm (30). En la fotografía (Foto N°4), se aprecia la configuración de las manchas del extracto vs, el de una planta certificada, y de un estándar de hiperosido
- Contaminantes físicos: se determina en la evaluación de aspecto, con la finalidad de evitar la presencia de partículas groseras visibles,
- Contaminantes químicos: identifica posibles contaminantes que causen deterioro del producto o de la salud del usuario final: como perdida por secado, residuo de ignición y metales pesados.
- Contaminantes biológicos: se descarta la presencia de contaminantes biológicos patógenos, y se monitorea la asepsia del proceso de extracción con el recuento microbiano (24).
- Parámetros farmacotécnicos, controlan que la calidad del insumo no afecte los procesos de transformación (10).

V.3. Formulación

- Se consideraron algunos aspectos del activo:
 - El análisis de sus parámetros reológicos, nos indicó que es un polvo muy fino, de flujo nulo.

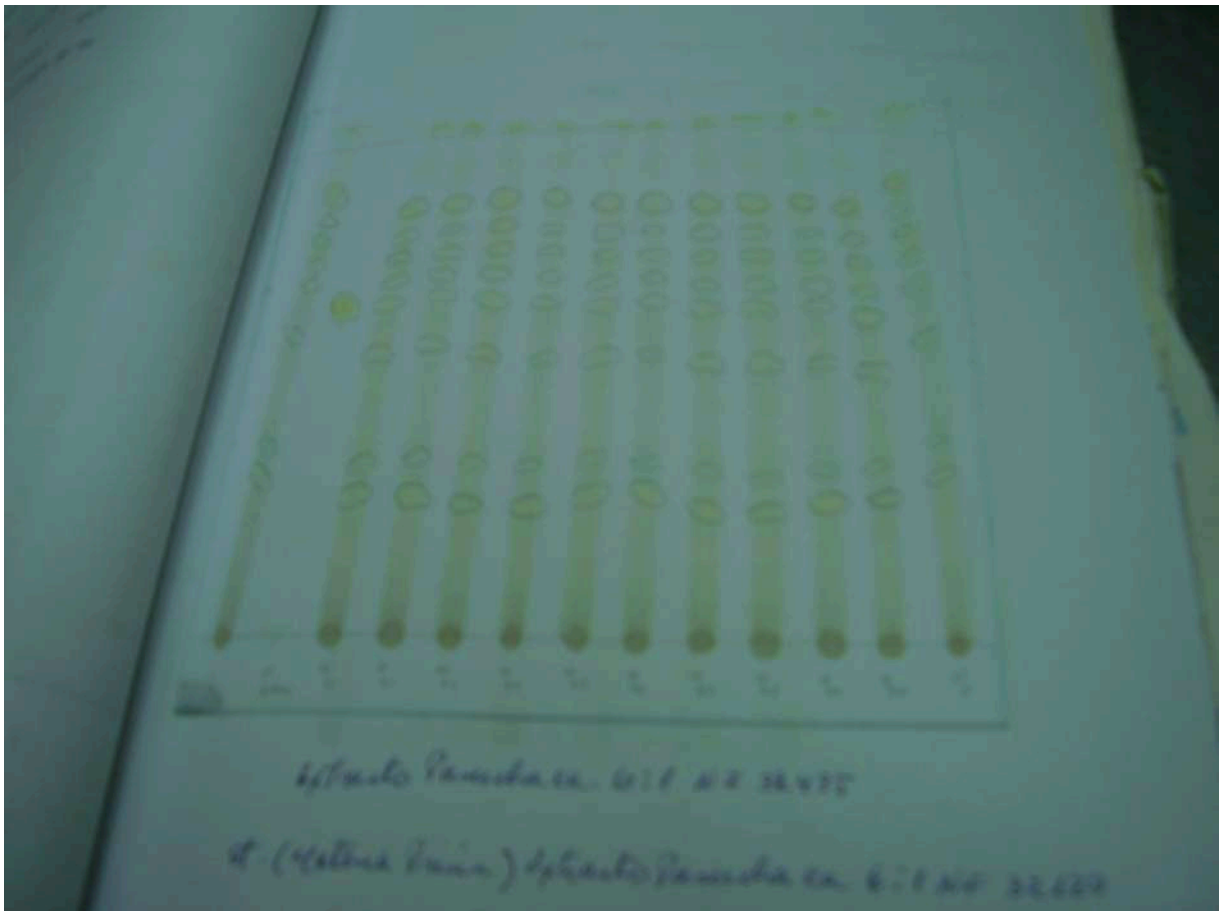


Foto 4.- Cromatograma del extracto atomizado de *Geranium dielsianum Knut* "Pasuchaca"

Sistema de soporte: Placa de silica gel 60 F₂₅₄.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: acido fórmico: agua (85:10:15)

Reveladores:

- Difenilboriloxietilamina, al 1% en metanol p.a.
- Polietilenglicol 4000 al 5% en etanol p.a.

- La evaluación de su composición indicó la presencia de maltodextrina, que es un derivado amiláceo muy higroscópico, y cuando se humedece se vuelve pegajoso (11) (31), lo cual es un inconveniente serio en una granulación húmeda por amasado, porque se forman masas muy compactas y difíciles de granular
- La evaluación de la proporción del activo, nos indicó que se utilizará aproximadamente el 70% de la fórmula como extracto, por lo cual la deficiencia de sus parámetros reológicos fue determinante (18, 22,23).
- Con estas consideraciones se decidió probar 3 metodologías distintas para obtener granulados:
 - Pre-compresión
 - Granulación húmeda en lecho fluido con solvente orgánico
 - Granulación húmeda con solvente mixto

En los resultados de las pruebas preliminares, se apreció que la pre-compresión no funcionaba, porque las tabletas no conseguían la suficiente cohesión, y se parten fácilmente. De otro lado la variación de pesos es mayor, evidenciando la persistencia de los problemas de flujo.

En el caso de la granulación con solvente orgánico, se puede apreciar que las tabletas empezaban a adherirse a los punzones, esto puede ser ocasionado por que en el proceso de secado del granulado, la evaporación del solvente, retiró la humedad residual del extracto, incrementando sus características higroscópicas, las cuales, pese a utilizar ambientes con humedad relativa por debajo del 60%, son lo suficientemente enérgicas como para captar agua del ambiente y causar adherencia en las superficies, por humectación de la maltodextrina. Adicionalmente los resultados de friabilidad, indicaron un fuerte desgaste, bastante cercano al límite aceptable, esto puede ser causado por el hecho que el aglutinante no se dispersó en forma homogénea en el granulado, porque el solvente se evaporó con demasiada rapidez.

La tercera opción, utilizando solvente mixto, permitió obtener un mejor granulado, muy compresible; que se evidenció por las durezas alcanzadas, persistieron los problemas de flujo pero en menor magnitud que las otras pruebas preliminares, manteniéndose dentro de las especificaciones de la uniformidad de peso. Con relación a la prueba de disgregación, se apreció

que es relativamente larga, por este motivo, en los siguientes lotes (lote 02 y 03) se reguló el tiempo de secado para mejorar la formación del granulo, obteniéndose en el lote 02 y 03 menores tiempos de disgregación (6% menor) y en el lote 03 un 36% menos.

De otro lado, las pruebas microbiológicas realizadas, indican un buen manejo de la asepsia durante el proceso.

Las muestras fueron emblisteradas utilizando como material PVDC, por las características higroscópicas del extracto, se sabe que el PVDC (cloruro de polivinilidieno) ofrece una mayor barrera contra la humedad (13).

V.4. Estudios de estabilidad

Se efectuaron las pruebas de estabilidad en condiciones normales a 25°C y 60% HR, durante 30 meses, observándose un incremento de la perdida por secado, peso promedio y dureza, evidenciándose la higroscopicidad del extracto que en el tiempo, y pese a tener una barrera contra la humedad (PVDC), llega a captar hasta 229% en algunos casos (lotes 01 y 03); pero, lo mas notable es que la humedad se incrementa hasta un valor promedio de: 7,45% (lote 01), 7,68% (lote 02) y 7,9% (lote 03). Estos datos indican que se llegó a un equilibrio en la humedad a partir del 6to. mes y este se incrementó ligeramente hasta el mes 30.

En cuanto a los demás parámetros, tales como identidad, friabilidad, disgregación y recuento microbiano, se mantienen estables. Es importante el parámetro de limite microbiano, porque significa que la forma de dosaje y el proceso de manufactura, desde la extracción hasta el emblisterado, evitaron la contaminación y proliferación microbiana.

V.5. Estudios de toxicidad

El estudio de “Dosis Letal Media” a diferentes tiempos indica que el consumo de 17,7636 g/kg peso en 24 horas ó 17,3142 g/kg peso en 48 horas ó 16,9724 g/kg peso en 72 horas causa la mortalidad del 50% de animales de experimentación. Aunque estos datos no son necesariamente extrapolables al ser humano, se podría mencionar que si se tratase de individuos de 70 kg de peso corporal, en el peor de los casos debería consumir 550 tabletas diarias durante 3 días o 1727 tabletas en un día para que se aprecie una mortalidad del 50%, cualquiera de estos hechos resulta poco probable, inclusive si hubiese el hecho manifiesto de causarse un daño propio.

V.6. Estudios Clínicos Fase II (28)

Se observa que los valores Iniciales de glucosa, hemoglobina glicosilada, creatinina y triglicéridos, se encuentran alterados con relación a los valores normales (33), inclusive en el caso de la hemoglobina glicosilada esta alteración es notable en relación a los parámetros de control para pacientes con intolerancia a la glucosa (34). Los resultados del estudio clínico, evidenciaron una reducción de la glucosa sanguínea en un 17% luego de un tratamiento con tabletas de 500 mg c/8 horas durante 45 días. De otro lado, la hemoglobina glicosilada se redujo en un 48%, indicativo del seguimiento de la enfermedad en forma retrospectiva, y que esta reducción se ha mantenido en el tiempo.

Otro factor que sufrió una variación significativa fueron los valores de creatinina, los cuales en el inicio se encuentran muy elevados, indicando un posible problema renal, luego del tratamiento con las tabletas de Pasuchaca, los valores se normalizaron.

En cuanto a los demás parámetros, se apreció que los valores básales no variaron significativamente, con excepción de los triglicéridos que tuvieron una reducción notable con la dosis de 500 mg c/8 horas x 45 días. Luego del tratamiento de 500 mg c/ 8 horas x 45 días, los parámetros alterados retornan a los valores normales

Con relación a los mecanismos de acción de los productos herbales con actividad hipoglicemiante, (35) se menciona los siguientes:

- Estimulación de las células β (*Gymnema sylvestra*)
- Retrazo del vaciamiento gástrico, reducción de la absorción de carbohidratos e inhibición del transporte de glucosa (*Trigonella foenum-graecum*)
- Incremento del almacenamiento de glucosa por los tejidos, depresión de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa e incremento de la oxidación de glucosa por la vía G6PDH (*Momordica charantia*)
- Reducción de la absorción de carbohidratos, e incremento del transporte y acumulación de glucosa y modulación de la secreción de insulina (*Panax ginseng*)

Karato (32), en un estudio para evaluar la actividad farmacológica del *Geranium dielsianum* describe que la actividad esta relacionada con la inhibición de la enzima α - glucosidasa, que retarda la absorción de carbohidratos, reduciendo los niveles de glucosa en sangre. El estudio clínico evidencia que el efecto se mantiene, pero no se

podría indicar si en el uso humano es el único mecanismo de acción, debido al efecto sobre la creatinina sérica, la cual también disminuye en el tratamiento.

Finalmente, la evaluación de los parámetros enzimáticos (TGO y TGP), evidencia que existen incrementos dentro de los valores normales, indicando que a las dosis administradas y por los periodos usados no se evidencia daño hepático. El mismo comentario se debe hacer con relación a la fosfatasa alcalina, cuyos valores no tuvieron una fluctuación significativa.

VI. CONCLUSIONES

1. Las tabletas del extracto atomizado de *Geranium dielsianum Knut* “Pasuchaca” cumplen los criterios de calidad establecidos en su desarrollo manteniendo sus características dentro de sus especificaciones por un periodo de 30 meses en condiciones normales (25°C y 60%HR).
2. La Dosis Letal media de las tabletas es 17,35 g/kg de peso corporal
3. Las Tabletas dosificadas en 500mg c/8 horas durante 45 días, causan la reducción en un 42% de la creatinina sanguínea y reducen en un 17% la glucosa sanguínea y la Hb glicosilada A1c en un 48%, por lo que se comprueba su efecto hipoglicemiante durante el tratamiento

VII. Referencias Bibliográficas

1. HUARACHA M.; (1991); *Toxicidad aguda y efecto hipoglicemiante de Geranium dielsianum Knuth (pasuchaca)*; Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico ; Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, Lima
2. MACBRIDE J.F. (1949), *Geraniaceae, Flora del Perú*, Field Mus. Nat. Hist. Bot. Ser. 13: 511 – 544
3. BRACK EGG A., (1999); *Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles del Perú*, CBC, 223
4. ROERSCH C. (1988), *Plantas medicinales del Surandino del Perú*; Centro de Medicina Andina, 32 – 35
5. TALLA O.; (2000); *Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de Geranium ayavacense en ratas tratadas con streptozotocin*; Primer Congreso Internacional Fito 2000; Lima
6. APUMAYTA U.; (2000); *Estudio fitofarmacológico (hipoglicemiante) y de toxicidad del extracto de Geranium ayavacense Willd (pasuchaca) en animales de experimentación*; Primer Congreso Internacional Fito 2000; Lima
7. DAVILA I.; (2000); *Efecto del Geranium weberbaueri "pasuchaca" y de Baccharis genistelloides "carqueja" sobre la glicemia en diabetes experimental inducida con aloxano en ratas albinas*; Primer Congreso Internacional Fito 2000; Lima
8. CHÁVEZ I.; (1998); *Actividad biológica de Geranium lechleri knuth (pasuchaca), sobre la glucemia en animales de experimentación*; Tesis 4031, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Lima
9. YEREN C.;(1994); *Efectos hipoglicemiantes del Geranium dielsianum Knuth (pasuchaca) y del Minthostachys setosa (muña)*, Revista Médica Peruana, 33 – 34

10. CARSTENSEN, PhD; (1993); *Pharmaceutical principles of solid dosage forms*, Technomic, Lancaster.
11. SHARAPIN NIKOLAI (2000); *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*, Convenio Andrés Bello - CYTED, Santa Fe de Bogotá.
12. LIST P.H.; (1989), *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press
13. VILA JATO, J. L. (1997), *Tecnología farmacéutica*. Volumen I. Editorial Síntesis. Madrid. p. 55-57
14. THE ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN (1994); *The Pharmaceutical Codex*; The Pharmaceutical Press; London.
15. CÓRDOBA B., M; CÓRDOBA D., M.; CÓRDOBA D., D. (1997) " *Influencia sobre las propiedades farmacotécnicas de la norfloxacin por preformulación con diferentes tipos de excipientes modernos de compresión directa*". *Industria Farmacéutica*, Año 2 (6): 91-96.
16. AULTON, M.E. (2002). " *Particle Science and Powder Technology*". En: *Pharmaceutics. The Science of dosage form design*. 2ª Edición. p. 139-210
17. FAULI T., C.(1993)*Tratado de Farmacia Galénica*.1ª Edición. Editorial Luzán 5 S.A. Madrid. p. 103; 197 – 205
18. FERNÁNDEZ-ARÉVALO, M; RABASCO, A. M. (1987) " *Importancia de los polvos en Tecnología farmacéutica*". *Industria Farmacéutica*, 5 : 115-118.
19. BRITTAIN, H. (2002) " *Particle-Size Distribution II: The Problem of Sampling Powdered Solids*". *Pharmaceutical Technology*, 1: 67-73

20. HANCOCK, B.; COLVIN, J.; MULLARNEY, M. Y ZINCHUK, A. (2003) "*Densidades relativas de polvos, mezclas, granulaciones secas y comprimidos de liberación inmediata de uso farmacéutico*". *Pharmaceutical Technology*, 62: 36-54
21. MERCK RESEARCH LABORATORIES. (1996) The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. Merck & Co, Inc. p. 2170.
22. BREÑA, MIRTHA (2005); *Diseño y Desarrollo de una Formulación para Gemfibrozilo 600 mg tableta Recubierta*, tesis para Optar el título de Químico Farmacéutico, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, Lima
23. LIEBERMAN, H. A.; LACHMAN, L. Y SCHWARTZ, J. B.(1989) *Pharmaceutical dosage forms: Tablets*. Volumen I. 2ª Edición. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 53-57
24. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION (2005); *USP 29*, Rand Mc. Nally
25. FDA, (2000), *Guidance on Q1A(R) Stability testing of new drug substances and products*; Federal Register (FDA) vol 65, N° 78/Friday, april 21
26. CARSTENSEN, PhD; (1995); *Drug Stability, principles and practices*, Technomic, Lancaster.
27. UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA (2002), Informe de Ensayo N° P015261/02 del 07/06/2002.
28. ARROYO JL., RONCEROS S., GARMENDIA F., VEGA M., ET AL (2005). *Effect of the aqueous extract of Geranium dielsianum Knuth (Pasuchaca) in glucose-intolerant patients. Clinical Investigation Institute. San Fernando School of Medicine of Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. (In Press)
29. WHO, (1998), *Quality Control Methods for Medicinal Plants Material*, WHO 1st. Ed. Geneve

30. LOCK, OLGA; (1994); *Investigación Fitoquímica*, PUCP, Lima
31. American Pharmaceutical Association, (2000), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Arthur H. Kibbe, 3rd. Ed, Washington
32. KARATO, M; (2006); *Inhibitory effects of Pasuchaca (Geranium dielsianum) Extract on α -glucosidase in Mouse*; Biosci.Biotechnol.Biochem, 70 (6), 1482 – 1484
33. Ballcells, A. (2002), *La Clínica y el Laboratorio*, 12 Ed. Masson, Barcelona
34. Selvin E. (2005) *Glycemic Control and Coronary Heart Disease Risk in Persons with and without Diabetes*. Arch.inter.med Vol 165, sept 12 2005, 1910 – 1916
35. Shane-Mc Whorter, L. (2001), *Biological Complementary Therapies: A Focus on botanical Products in Diabetes*, Diabetes spectrum, Vol 14, N° 4 , 2001, 199 - 208

VIII. ANEXOS

VIII.1. CERTIFICADO DE ESPECIE

HAMILTON W. BELTRAN S.
CONSULTOR BOTANICO
Calle Alfredo Novoa No. 230
Miraflores - San Miguel
whimoncosta@gmail.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo Colegiado quien suscribe CERTIFICA que, la muestra botánica de la planta conocida como "PASUCHACA", proporcionada por **LABORATORIOS HERSIL S.A.**, rotulada con el código O1, ha sido estudiada científicamente y determinada como Geranium dielsianum y de acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas:

DIVISION : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Rosidae
ORDEN : Geraniales
FAMILIA : GERANIACEAE
GENERO : Geranium
ESPECIE : Geranium dielsianum Knuth

Se expide la presente certificación a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Lima 14 junio 2005


Bigo. HAMILTON BELTRAN

Hamilton W. Beltrán S.
Biólogo - Rosidae
C.B.P. 2719

40047

VIII.2. ESPECIFICACIONES INSUMOS

VIII.2.1. EXTRACTO DE G. Dielsianum

ESPECIE BOTÁNICA: Geranium dielsianum

1.- **ASPECTO** Polvo homogéneo de color marrón.

2.- **SOLUBILIDAD** Soluble en agua y en etanol.

3.- **IDENTIFICACIÓN** Positivo
Cromatografía en capa fina

4.- **PERDIDA POR SECADO** Máximo 5%
(105°C por 2 horas)

5.- **RESIDUO DE IGNICIÓN** Máximo 1%

6.- **pH** (So. 1% en agua) 4.0 – 5.0

7.- **METALES PESADOS** Máximo 10 ppm
(Método II USP)

8.- **TAMAÑO DE PARTÍCULA (*)** **Pasa tamiz N° 30 > 98%**

Pasa tamiz N° 60 > 80%

Pasa tamiz N° 100 > 50%

9.- **LÍMITE MICROBIANO**

Recuento bacteriano	100 UFC / g
Recuento de hongos y levaduras	20 UFC / g
<i>Salmonella s.p.</i>	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente
<i>E. coli</i>	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente
<i>Coliformes</i>	<10 UFC/g

NORMA TÉCNICA: Propia

(*) **RANGO REFERENCIAL**

VIII.2.2. SOLVENTE ORGÁNICO

- 1.- **ASPECTO** Líquido claro, incoloro, movable, volátil, con olor característico y produce sensación ardiente sobre la lengua, se volatiliza fácilmente incluso es las bajas temperaturas y la ebullición es cerca de 78°. Es inflamable.
- 2.- **SOLUBILIDAD** Miscible con agua, y con prácticamente todos los solventes orgánicos.
- 3.- **CLARIDAD DE SOLUCIÓN** Clara y no más opalescente que la suspensión opalescente I
- 4.- **COLOR DE SOLUCIÓN** Máx. B9
- 5.- **IDENTIFICACIÓN** Ensayos A, B y C
- 6.- **GRAVEDAD ESPECÍFICA** 0,812 – 0,816, a 15,56°C indicado entre 92,3 % y 93,8 % por peso, o entre 94,9% y 96% por volumen.
0,80761 - 0,81175 a 20°C (según tabla de densidades)
- 7.- **ACIDÉZ O ALCALINIDAD** Máximo 1.0 ml de NaOH 0.01N (30 ppm expresado como ácido acético)
- 8.- **ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA** Máx. 0,40 de absorbancia en 240 nm
Máx. 0,30 de absorbancia entre 250 nm a 260 nm
Máx. 0,10 de absorbancia entre 270 nm a 340 nm
- 9.- **LÍMITE DE RESIDUO NO VOLÁTIL** Máx. 2,5 mg / 100 mL
- 10.- **SUSTANCIAS INSOLUBLES EN AGUA** Ausente.
- 11.- **ALDEHIDOS Y OTRAS SUSTANCIAS ORGÁNICAS EXTRAÑAS.** Ausente.
Color rosado del permanganato de potasio 0,1 N, no desaparece totalmente durante 5 minutos.
- 12.- **ALCOHOL AMÍLICO Y SUST. NO VOLÁTILES, CARBONIZABLES, ETC.** Ausente.
- 13.- **LÍMITE DE ACETONA Y ALCOHOL ISOPROPÍLICO** Max. 80 µg en Acetona
- 14.- **METANOL** Ausente.
- 15.- **LÍMITE MICROBIANO**
- | | |
|--------------------------------|-------------|
| Recuento bacteriano | 100 UFC / g |
| Recuento de hongos y levaduras | 50 UFC / g |
| <i>Salmonella s.p.</i> | Ausente |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Ausente |
| <i>E. coli</i> | Ausente |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Ausente |

NORMA TÉCNICA

USP

VIII.2.3.DILUYENTE INSOLUBLE

1.- <u>ASPECTO</u>	Polvo cristalino, fino, de color blanco, inodoro. Consiste en partículas de flujo libre, no fibrosas.
2.- <u>SOLUBILIDAD</u>	Insoluble en agua, ácidos diluidos y en la mayoría de los solventes orgánicos; prácticamente insoluble en solución de hidróxido de sodio (1 en 20).
3.- <u>IDENTIFICACIÓN</u>	Positivo A y B
4.- <u>CONDUCTIVIDAD</u>	No mayor a 75µs.
5.- <u>pH</u>	5,0 - 7,0
6.- <u>PÉRDIDA POR DESECACIÓN</u>	3,0% – 5,0 %
7.- <u>RESIDUO DE IGNICIÓN</u>	Máximo 0,05%
8.- <u>DENSIDAD DEL POLVO</u>	0,31 - 0,37 g/ mL
9.- <u>SUSTANCIAS SOLUBLES</u> <u>EN AGUA</u>	No mayor a 0,24% (Máx. 12 mg)
10.- <u>SUSTANCIAS SOLUBLES</u> <u>EN ÉTER</u>	No mayor a 0,05 % (Máx. 5 mg)
11.- <u>METALES PESADOS MET II</u>	Máximo 0,001%
12.- <u>TAMAÑO DE PARTÍCULA (*)</u>	Retiene malla N° 40: máximo 2 % Retiene malla N ° 60: mínimo 10 % Retiene malla N°100: mínimo 50%
13.- <u>IMPUREZAS ORGANICAS VOLATILES.</u>	Pasa la prueba (*)
14.- <u>GRADO DE POLIMERIZACION</u>	Entre 215 – 240 (*)
15.- <u>LIMITE MICROBIANO</u>	
Recuento bacteriano	100 UFC / g
Recuento de hongos y levaduras	50 UFC / g
<i>Salmonella s.p.</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausente
<i>E. coli</i>	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente

(*) Según certificado de proveedor

NORMA TÉCNICA USP

VIII.2.4. AGLUTINANTE

1.- ASPECTO

Polvo granular o polvo blanco a blanco amarillento inodoro o casi inodoro.

2.- SOLUBILIDAD

Insoluble en agua, soluble en cloruro de metileno y en una mezcla de 20g de etanol y 80g de tolueno, ligeramente soluble en etilacetato y metanol, practicamente insoluble en glicerol al 85% y propilenglicol. Las soluciones pueden mostrar una opalescencia leve.

3.- IDENTIFICACIÓN

Positivo A y B (IR)

4.- VISCOSIDAD

9 cps – 11cps (90% -110%) *

5.- ACIDÉZ O ALCALINIDAD

Max. 0,5 mL de NaOH 0,01N
Max. 0,5 ml de HCl 0,01N

6.-CLORUROS

Max.0,1%

7.- P'PERDIDA POR SECADO

Max. 3,0 %

8.- METALES PESADOS

Max. 20 ppm

9.- PLOMO

Max. 10 ppm (*)

10.- RESIDUO DE IGNICIÓN

Max. 0,40 %

11.- IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES

Cumple los requerimientos (*)

12.-ACETALDEHIDO

Max. 100 ppm (*)

13.- DOSAJE

Entre 44,0% -51,0% de Grupos Etoxy (-OC₂H₅),
calculados en base seca (*)

14.- LÍMITE MICROBIANO (*)

Recuento bacteriano
Recuento de hongos y levaduras
Salmonella s.p.
Pseudomona aeruginosa
E. coli
Staphylococcus aureus

100 UFC / g
50 UFC / g
Ausente
Ausente
Ausente
Ausente

NORMA TECNICA

USP

VIII.2.5. GLIDANTE

1.- ASPECTO

Polvo blanco, extremadamente fino, muy liviano, no arenoso.

2.- SOLUBILIDAD

Insoluble en agua, en ácidos (excepto fluorhídrico), soluble en soluciones calientes de hidróxidos alcalinos.

3.- IDENTIFICACIÓN

Positivo

4.- pH

3,5 – 5,5 (Dispersión al 4%)

5.- PÉRDIDA POR DESECACIÓN

No mayor a 2,5%

6.- PÉRDIDA POR IGNICIÓN

No mayor a 2%

7.- ARSÉNICO <MET. I>

Máximo 8 ppm. (*)

8.- IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES <MET.IV>

Cumple la prueba (*)
Cloroformo 60 µg /g
1,4-Dioxano380 µg /g
Cloruro de metileno 600 µg /g
Tricloroetileno 80 µg /g

9.- VALORACIÓN

99 – 100,5 % de Si O₂

10.- DENSIDAD APARENTE

0,045 - 0,055 g/ml (Con compresión)

11.- ÁREA SUPERFICIAL

Límite: 175 – 225 m²/g (*)

(*)Según certificado

NORMA TÉCNICA

USP

VIII.2.6.LUBRICANTE ORGÁNICO

<u>1.- ASPECTO</u>	Polvo untuoso, o masa cerosa o escamosa de consistencia dura de color blanco a ligeramente de color amarillo.
<u>2.- SOLUBILIDAD</u>	Insoluble en agua, soluble en alcohol absoluto, cloroformo y éter.
<u>3.- IDENTIFICACIÓN</u>	Absorción infrarroja: positivo
<u>4.-PUNTO DE FUSIÓN</u>	Entre 54,5°C a 56,5°C.
<u>5.-ÍNDICE DE YODO</u>	No mayor de 4,0
<u>6.-RESIDUO DE IGNICIÓN</u>	No mayor de 0,1%
<u>7.-METALES PESADOS</u>	No mayor de 0,001% .
<u>8.-ÁCIDOS MINERALES</u>	Cumple los requerimientos
<u>9.-GRASAS NEUTRAS O PARAFINAS</u>	Cumple los requerimientos.
<u>10.- IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES</u>	Cumple los requerimientos (*).
<u>11.- TAMAÑO DE PARTICULA</u>	Pasa malla # 100 [95% - 100%] (*). Pasa malla # 30 [99,70% - 100%]
<u>12.- DOSAJE</u>	El contenido de ácido esteárico es de 40% - 50,0 % la del ácido palmítico es de 46,0 % - 56,0 % . y la suma del ácido esteárico y el ácido palmítico es 90% - 100,0 %. C14 % 0,00 % - 5,0 % C16 % 46,0 % - 56,0 % C18 % 40,0 % - 50,0 % C16 +C18 % 90,0 % -100,0 % (*).
<u>13.- NIKEL</u>	Max. 1 ppm. (*)
<u>14.- VALOR ÁCIDO</u>	194 – 212. (*).
<u>15.- NUMERO DE SAPONIFICACIÓN</u>	207 – 211 (*).
<u>16.- ARSÉNICO</u>	Max. 4 ppm. (*).
<u>17.- COLOR DE TRANSMITANCIA</u>	440 nm - 92 – 100 (*). 550 nm - 98 – 100
(*) Según certificado NORMA TÉCNICA	USP/BP

VIII.2.7. DISGREGANTE

- | | |
|--|--|
| 1.- <u>ASPECTO</u> | Polvo blanco, que fluye libremente. |
| 2.- <u>SOLUBILIDAD</u> | Parcialmente soluble en agua, insoluble en alcohol, éter y en otros solventes orgánicos. |
| 3.- <u>IDENTIFICACIÓN</u> | Ensayos A, B y C.- Positivo |
| 4.- <u>pH</u> | 5,0 – 7,0 (Sol. 1%) |
| 5.- <u>PÉRDIDA POR DESECACIÓN</u> | Máximo 10% |
| 6.- <u>RESIDUO DE IGNICIÓN</u> | 14% - 28% calculado en base seca. |
| 7.- <u>METALES PESADOS</u> | Máximo 0,001% |
| 8.- <u>CONT DE SUST SOL. EN AGUA</u> | Máximo 10 % |
| 9. - <u>VOLUMEN DE SEDIMENTACIÓN</u> | 10 mL - 30 mL |
| 10. - <u>IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLATILES</u> | Pasa la prueba (*) |
| 11. - <u>CLORURO DE SODIO Y GLYCOLATO DE SODIO</u> | Máximo 0,5 % (*) |
| 12.- <u>GRADO DE SUSTITUCIÓN</u> | 0,6 % - 0,85 % (*) |

13. - LIMITE MICROBIANO

Recuento bacteriano	100 UFC / g
Recuento de hongos y levaduras	50 UFC / g
<i>Salmonella s.p.</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausente
<i>E. coli</i>	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente

(*) Según Certificado

NORMA TÉCNICA

USP

VIII.2.8.DILUYENTE SOLUBLE

1.- <u>ASPECTO</u>	Polvo de color blanco, que fluye libremente.
2.- <u>SOLUBILIDAD</u>	Libre pero lentamente soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol.
3.- <u>IDENTIFICACIÓN</u>	Positivo
4.- <u>TRANSPARENCIA Y COLOR DE LA SOLUCIÓN</u>	Máximo 0,04 de Absorbancia
5.- <u>ROTACIÓN ESPECÍFICA</u>	+ 54,4 ° - + 55,9 °
6.- <u>ACIDÉZ O ALCALINIDAD</u>	Máximo 0,4 mL de hidróxido de sodio 0,1 N / 6 g.
7.- <u>PÉRDIDA POR DESECACIÓN</u>	Máximo 0,5 %
8.- <u>CONTENIDO DE AGUA</u>	4,5 - 5,5 %
9.- <u>RESIDUO DE IGNICIÓN</u>	Máximo 0,1 %
10.- <u>pH</u>	4,0 – 6,5
11.- <u>METALES PESADOS</u>	Máximo 5 ppm
12.- <u>TAMAÑO DE PARTÍCULA</u>	Pasa 250 Micrones 90 %. (según certificado) Pasa 180 Micrones 78 % Pasa 150 Micrones 40 % - 65 % Pasa 75 Micrones Max. 20 %
13.- <u>PROTEÍNAS E IMPUREZAS ABSORBEN LA LUZ</u>	210 nm - 220 nm : Máx. 0,25 de absorbancia 270 nm - 300 nm : Máx. 0,07 de absorbancia
14.- <u>LÍMITE MICROBIANO</u>	
Recuento bacteriano	100 UFC / g
Recuento de hongos y levaduras	50 UFC / g
<i>Salmonella s.p.</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausente
<i>E. coli</i>	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente
NORMA TECNICA	USP / TECNICA PROPIA.

VIII.2.9. SOLVENTE ACUOSO

1.- <u>ASPECTO</u>	Líquido claro, incoloro, inodoro.
2.- <u>pH</u>	5,0 – 7,0
3.- <u>CLORUROS</u>	Máx. 10 µg de Cl en 20 ml
4.- <u>SULFATOS</u>	Ausente (No se produce turbidez)
5.- <u>SUSTANCIAS OXIDABLES</u>	Ausente
6.- <u>DIÓXIDO DE CARBONO</u>	Ausente (La mezcla permanece clara)
7.- <u>CONDUCTIVIDAD a 25°C</u>	Máximo 1,3 us
8. - <u>RESIDUO DE EVAPORACIÓN</u>	Máximo 0,001 % (1 mg)
9.- <u>AMONIO</u>	Máximo 0,2 ppm
10.- <u>CALCIO Y MAGNESIO</u>	Máximo 0,5 ml EDTA 0.01M
11.- <u>CONTROL MICROBIOLOGICO</u>	
Recuento bacteriano	100 UFC / g
<i>Salmonella s.p.</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausente
<i>Coliformes</i>	Ausente

VIII.2.10. LUBRICANTE INORGÁNICO

1.- ASPECTO

Polvo cristalino, muy fino, color blanco o blanco grisáceo. Es untuoso, se adhiere rápidamente a la piel, y es libre de partículas arenosas.

2.- SOLUBILIDAD

Prácticamente insoluble en agua y en soluciones diluidas de ácidos y hidróxidos alcalinos.

3.- IDENTIFICACIÓN

Cumple USP

4.- PÉRDIDA POR SECADO

Máximo 1,0 %

5.- PÉRDIDA POR IGNICIÓN

Máximo 6,5 %

6.- SUSTANCIAS SOLUBLE EN ÁCIDO

Máximo 2,0 % (10 mg.)

7.- SUSTANCIAS SOLUBLES EN AGUA

Máximo 0,1 % (5 mg.)

8.- REACCIÓN

Neutra al papel de tornasol

9.- HIERRO SOLUBLE EN AGUA

Ausente

10.- METALES PESADOS

Máximo 0,004 %

11.- LÍMITE MICROBIANO

Recuento bacteriano
Recuento de hongos y levaduras
Salmonella s.p.
Pseudomonas aeruginosa
E. coli
Staphylococcus aureus

100 UFC / g
50 UFC / g
Ausente
Ausente
Ausente
Ausente

NORMA TÉCNICA

USP

VIII.3. TECNICAS ANALITICAS

VIII.3.1. Distribución Granulométrica

Método de tamización por agitación mecánica.

Procedimiento:

Se toman 03 muestras de los siguientes puntos de muestreo centro, derecha e izquierda del equipo mezclador, cada muestra de aproximadamente 9g. Se tomará un pool de 25 g de las 03 muestras.

Colocar la muestra en el tamizador, agitar con una frecuencia de oscilación de 250 ciclos por minuto en un tiempo de 20 minutos provisto de las siguientes mallas: N° 40 (425µm) – N° 60(250µm) – N°100 (150µm) – N°200 (75µm) – N°270(53µm). (28)

VIII.3.2. Densidad aparente sin compactación y con compactación

Método de la Probeta

Procedimiento:

Pesar 50g. de polvo, dejar caer cuidadosamente la muestra en una probeta graduada de 100 ml la cual da una primera lectura (DASC), luego se procede a golpetear 1250 veces la probeta sobre una superficie horizontal desde una altura de 14mm (+/- 2 mm) a 120 – 150 golpes por minuto y se lee el DACC. (28)

DASC: Densidad aparente sin compactación

DACC: Densidad aparente con compactación

VIII.3.3. Compresibilidad

Método por fórmula

Procedimiento:

Con los datos anteriormente obtenidos se puede calcular a partir de la siguiente expresión (28):

$$C \% = \frac{DACC - DASC}{DACA} * 100$$

VIII.3.4. Humedad

Método de pérdida de peso por Rayos infrarrojos

Procedimiento:

Se toman 03 muestras de los siguientes puntos de muestreo centro, derecha e izquierda del equipo mezclador, cada muestra de aproximadamente 5 g y hacer un pool de aprox.15 g.

Pesar 10 g de muestra esparcida de modo uniforme sobre el platillo de la balanza Ohaus. Encender el equipo y dejar correr la muestra por 15 minutos. Luego leer el % de humedad.

VIII.3.5. Ángulo de Reposo

Método del embudo

Procedimiento:

Se utilizó un embudo de diámetro: 6 cm con un abertura de 0,5 cm de diámetro ubicado a 5cm de la superficie plana y redonda de 6 cm de diámetro. Tapar la salida inferior del embudo y colocar 20 g de mezcla, luego abrir el punto de salida del embudo dejando caer libremente la mezcla sobre la superficie inferior redonda, medir la altura del cono formado por la mezcla.

Para hallar el ángulo de reposo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\alpha = \arctg \frac{h}{r}$$

Donde:

r: es el radio del cono formado que es constante 3 cm.

h: es la altura del cono formado.

VIII.3.6. Velocidad de flujo

Procedimiento:

Se utiliza el mismo equipo anterior cronometrando el tiempo que tarda en caer la totalidad del polvo y expresando el resultado final en g/seg.

VIII.3.7. Aspecto de tabletas

Método inspección visual

Procedimiento

Se toman muestras de 10 tabletas cada una de la máquina tabletedora en operación al inicio, medio y final del proceso, se observa visualmente cada

tableta muestreada sobre fondo blanco y luz blanca. Se anotarán los defectos encontrados.

Clasificación de defectos:

Defectos críticos: presencia de partículas metálicas en su superficie, presencia de puntos negros mayores a 1mm.

Defectos mayores: comprimidos rotos, laminados, con bordes defectuosos, muy frágiles.

Defectos menores: comprimidos con ligero desgaste en el borde, con ligera porosidad en su superficie.

VIII.3.8. Uniformidad de peso

Procedimiento

Tomar muestras de 10 tabletas cada una de la maquina tableteadora en operación, pesar individualmente en la balanza analítica con aproximación al milésimo y registrar. Evaluar según USP 28.

Frecuencia de muestreo para:

Fórmulas del 1 al 8: cada 3 minutos.

Fórmulas A, B y C: cada 2.5 minutos.

VIII.3.9. Dureza

Procedimiento

Se toman muestras de 10 tabletas cada una de la máquina tableteadora en operación, con ayuda de una pinza metálica colocar el comprimido en el Durómetro, medir la fuerza requerida para romper la tableta, se calcula la media y se registra.

Frecuencia de muestreo: 5 minutos

VIII.3.10. Friabilidad

Procedimiento

Tomar muestras al inicio, medio y final del proceso, 10 tabletas las cuales deberán ser despolvadas cuidadosamente antes de llevar a cabo la prueba. Pesar las tabletas (Pi)

Determinar la friabilidad a 25 rpm durante 4 minutos en el friabilizador según USP.

Retire con una pinza las tabletas del equipo, libres de polvo (excepto las rotas) y pesarlas (Pf)

Cálculos:

$$\frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 = \% \text{ Friabilidad}$$

Donde:

Pi = Peso inicial de las tabletas

Pf = Peso final después del rodamiento de las tabletas

VIII.3.11. Disgregación

Procedimiento

Se toman muestras de 6 tabletas cada una de la máquina tabletedora en operación al inicio y final del proceso de compresión, las cuales son colocadas en las canastillas del equipo de desintegración según lo establecido en USP. Se registra los tiempos obtenidos

VIII.3.12. Identidad :

CCF:

Estándar: fracción soluble en metanol

Muestra: fracción soluble en metanol

Condiciones cromatográficas

Sistema de soporte: Placa de Silica Gel 60 F₂₅₄.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: ácido fórmico: agua (85:10:15)

Sistema de revelado químico:

Reactivo: Producto natural (NP).- solución A.

Reactivo: Polietilenglicol – 4000 (PEG).- Solución B.

Preparación solución A: Difenilboriloxietilamina (NP), al 1% (Peso/volumen) en metanol p.a.

Preparación solución B: Polietilenglicol – 4000 (PEG) al 5% (peso/volumen) en etanol p.a.

Frente de solvente: 15,5 cm

Observar al UV a 365 nm

Resultados

En el UV a la longitud de onda de 365 nm: el estándar secundario y la muestra de Pasuchaca tabletas presenta 6 manchas fluorescentes que se intensifican:

5 de color naranja con Rf: 0,12; 0,45; 0,52; 0,61; 0,68.

1 de color verde con Rf: 0,37

Se usó como patrón referencial Hiperósido (2mg/10ml en metanol), como recurso analítico el cual presenta en el UV a la longitud de onda de 365 nm 1 mancha fluorescente color naranja con Rf: 0,45.

VIII.3.13. Análisis microbiológico

Reactivos:

Buffer pH 7,2

Solución stock:

Disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 ml de agua destilada. Ajustar el pH a $7,2 \pm 0.1$ con hidróxido de sodio TS (aproximadamente 175 ml), y completar a 1000 ml con agua destilada. Guardar bajo refrigeración.

Para uso, diluir la solución stock 1 a 800 con agua, agregar 4% de Tween 20 y 0,5% de lecitina de soya, luego de hervir por 20 minutos para disolver, dispensar en matraces con 90 ml y esterilizar.

MATERIALES Y EQUIPOS

- ♦ Pipetas estériles
- ♦ Placas estériles
- ♦ Estufas de incubación
- ♦ Autoclave
- ♦ Horno

PROCEDIMIENTO.

a) Recuento de aerobios totales (Método Plate Count)

Disolver 10 g de muestra si es sólida o mezclar 10 mL si la muestra es líquida en 90 ml (10^{-1}) de buffer pH 7,2, diluir 10 ml de la última dilución en 90 ml (10^{-2}) y así sucesivamente.

Pipetear 1 mL de cada dilución por duplicado en placas petri estériles, adicionar 15 a 20 mL de Agar Trypticase Soya, previamente fundida y temperada a 45 °C, cubrir las placas, mezclar la muestra con el Agar fundido con movimientos circulares e incubar por 24 a 48 horas a 30 – 35 °C.

Después de la incubación, examinar las placas, contar el número de colonias y expresar el promedio de las 2 placas en términos de número de microorganismos por gramo (g) o por mL de muestra.

Si no se observa crecimiento en las placas se expresará el resultado como "menor que 10 microorganismos por g ó mL de muestra".

b) Recuento total de Hongos y levaduras.

Proceder como en el método de Recuento de aerobios totales, utilizar en vez de Agar Casoy, Agar Saboraud Dextrosa.

Incubar las placas petri de 5 a 7 días, de 20 °C a 25 °C.

c) Recuento de coliformes :

Se deberá pipetear 1 mL de la primera dilución por triplicado en tubos conteniendo 9 mL de Caldo lactosado verde brillante de bilis 2 %, luego tomar de esta misma dilución 0,1 mL y pipetear por triplicado a tubos conteniendo 9 mL de Caldo lactosado verde brillante de bilis 2 %, finalmente se debe tomar de la segunda dilución 0,1 mL por triplicado a tubos conteniendo 9 ml de Caldo lactosado verde brillante de bilis 2 %,incubar a 30 – 35 °C /24 a 48 horas .

Luego de transcurridos las 48 horas se deberá verificar los tubos que presenten turbidez y presencia de gas para proceder a repicar en forma individual cada uno de los tubos a una placa conteniendo Agar Eosina azul de Metileno (EMB) ó Agar Endo ó Agar Violeta Rojo Bilis (Agar VRBD) , incubándolos a 30 a 35 °C /24 - 48 horas .

Transcurrido este lapso de tiempo se efectúa la lectura según el agar empleado :

En Agar Emb :Colonias negras con centro negro ó colonias mucosas rosado naranja.

En Agar Endo : Colonias rojas rodeadas de halo rojo

En Agar VRBA . Colonias rojo oscuro con diámetro mayor de 5 mm .

Realizar la lectura de las placas con lectura confirmada de acuerdo a la tabla adjunta

Tabla de coliformes					
Número de tubos positivos			Índice de NMP/100 g	Limite de confianza 95 %	
3 tubos de 10 mL	3 tubos de 1 mL	3 tubos de 0.1 mL		Inferior	Superior
0	0	1	<3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

d) Determinación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

Disolver 10 g de muestra si es sólida o mezclar 10mL si la muestra es líquida en 90 mL de Caldo tripticase soya mezclar e incubar a 30 – 35 °C de 24 a 48 horas. Si se observa crecimiento (turbidez), sembrar una asada por estrías en la superficie de placas petri conteniendo Agar Voguel Johnson (Agar Baird Parker o Agar manitol salado y en Agar cetrimide). Incubar invertido en estufa de incubación a 30 – 35 °C, 24 - 48 horas y posteriormente examinar.

Si en ninguna de las placas se observa colonias con características de la tabla 1 y 2, la muestra se encuentra libre de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

TABLA 1

Características morfológicas de *Staphylococcus aureus* en medios selectivos

Medio selectivo	Agar Voguel Johnson	Agar manitol salado	Agar Baird Parker
Características morfológicas de la colonia	Colonias negras rodeadas de halo amarillo	Colonias amarillas con halo amarillo	Negra brillante rodeada por halo claro de 2 a 5 mm.
Test Coagulasa	Positivo	Positivo	Positivo
Coloración Gram	Coco gram positivo	Coco gram positivo	Coco gram positivo

TABLA 2

Características morfológicas de *Pseudomonas aeruginosa* en medios selectivos:

Medio selectivo	Agar cetrimide	Agar pseudomona para detección de fluorescencia	Agar pseudomonas para detección de piocianina
Características morfológicas de la colonia	Generalmente verdosa	Generalmente incoloras o amarillas	Generalmente verdosas
Fluorescencia en luz ultravioleta	Verde	Amarilla	Azul
Test oxidasa	Positivo	Positivo	Positiva
Coloración gram	Bacilos gram negativos	Bacilos gram negativos	Bacilos gram negativos

Test Coagulasa (para *Staphylococcus aureus*)

Transferir una asada de la colonia sospechosa del medio Voguel Johnson, Agar manitol salado o Agar Baird Parker a tubos conteniendo 0,5 mL de plasma de conejo

o caballo. Incubar a 37 °C en un Baño María, examinar los tubos a las 3 horas hasta 24 horas simultáneamente se corren controles positivo y control negativo.

Si no hay coagulación de ningún grado la muestra reporta ausencia de *Staphylococcus aureus*.

Prueba de oxidasa y pigmentos para *Pseudomonas aeruginosa*.

Transferir una colonia de la superficie del Agar cetrimide (con la ayuda de un asa de kooles) a Agar P y Agar F para la detección del pigmento piocianina y fluoresceína respectivamente. Luego incubar las placas invertidas a 35 °C ± 2 °C por 3 días. Transcurrido el tiempo examinar las placas Agar P y F bajo una lámpara de luz ultravioleta y evidenciar la presencia de fluorescencia. Verificarán en Agar cetrimide si existen colonias que tienen las características mencionadas en la tabla 2.

Confirmar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* con la prueba de Oxidasa,

Test oxidasa (para *Pseudomonas aeruginosa*)

Transferir una asada de la colonia sospechosa sobre el papel filtro el cual previamente ha sido impregnado con n.n -dimethyl – p - fenilenediamina dicloruro, si no hay desarrollo de coloración rosada a púrpura se reportará ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

e) Determinación de especies *Salmonella sp* y *Escherichia coli*

Disolver 10 g de muestra si es sólida o 10 mL si la muestra es líquida en 90 mL de Caldo lactosado, incubar a 35 °C, 18 - 24 horas. Examinar el medio, si hay crecimiento. pipetear 1 mL en 10 mL de Caldo tetrationato, mezclar e incubar por 12 a 24 horas.

e.1 Test para especies de *Salmonella sp*.

Llevar una asada de Caldo Tetrationato inoculado con la "muestra" y sembrar en placas petri con Agar verde brillante; Agar xilosa lisina desoxicolato, Agar bismuto sulfito.

Incubar a 30 – 35 °C por 24 – 48 horas. Examinar si ninguna de las colonias cumple con lo descrito en la Tabla 3, existe ausencia de *Salmonella sp*.

Si cumple con las características de la Tabla 3, sembrar en profundidad en un tubo conteniendo Agar triple azúcar (Agar inclinado). Incubar 30 – 35 °C por 24 – 48 horas

y examinar. Si se observa que la superficie indica presencia de alcalinidad debido al color rojo (superficie) y en la base la presencia de acidez (color amarillo) entonces se deberá seguir los métodos de análisis establecidos de la AOAC para confirmar la presencia de Salmonella sp.

En caso contrario se deberá reportar ausencia de Salmonella sp.

e.2 Test para *Escherichia coli*

Sembrar una asada del Caldo lactosado con la muestra sobre la superficie de una placa petri conteniendo Agar Mac Conkey, incubar a 30 – 35 °C por 24 a 48 horas y examinar. Si hay crecimiento de colonias características (Tabla N°4) sobre Agar Mac Conkey, inocular una asada sobre una placa conteniendo Agar EMB. Incubar a 30 – 35 °C por 24 – 48 horas. Transcurrido el tiempo, si no se evidencia el crecimiento característico como se indica en la tabla N°4, se puede afirmar que hay ausencia de Escherichia coli en caso contrario, se deberá confirmar los resultados realizando la bioquímica correspondiente.

TABLA 3

Características morfológicas de especies de Salmonella sp. en medios selectivos.

MEDIO SELECTIVO	DESCRIPCION DE LA COLONIA
Agar verde brillante	Colonias pequeñas, transparentes, incoloras o rosadas a blancas opacas (frecuentemente rodeadas de halo rosado)
Agar xilosa - lisina - desoxicolato	Colonias rojas (con o sin centros negros)
Agar bismuto sulfito	Negro o verdosas

TABLA 4

Medios selectivos	Agar Mac Conkey	Agar EMB
Características morfológicas	Colonia roja con halo precipitado	Colonias oscuras azuladas con brillo metálico
Coloración gram	Coco bacilo gram positivo	Coco bacilo gram negativo